
Arbeit aus dem Institut für Lebensmittelchemie
der Technischen Universität Berlin
Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan

Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemiker
Patrick Billian

Vom Fachbereich 15
-Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie-
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

Prüfungsausschuß:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ing. K. Krenkel
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan
Prof. Dr. Ing. K. Rubach

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 28.04.2000

Berlin 2000
D 83
FB 15 Nr. 173

Abstract

"Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden"

In der vorliegenden Arbeit werden eine Reihe von analytischen Methoden zur chemischen Charakterisierung von Alkylpolyglucoside (APG) beschrieben. APG stellen zumeist komplex zusammengesetzte Gemische dar, die eine Vielzahl an homologen und stereoisomeren Komponenten enthalten. Die große Bandbreite der Polarität der Einzelkomponenten bereitet ebenso große Schwierigkeiten wie die fehlende UV-Aktivität der Verbindungen.

Zunächst wurden dünnstschichtchromatographische Methoden entwickelt, mit denen synthetische Abwässer einfach und schnell auf die Anwesenheit von APG untersucht werden konnten. Durch die Detektion mit DAP-Reagenz gelang es Matrixeffekte weitgehend zu reduzieren. Quantitative Bestimmungen wurden zu Beginn der Arbeit mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) durchgeführt. Die Trimethylsilylderivate der APG wurden gaschromatographisch nach ihrem Alkylrest sowie nach verschiedenen Strukturmerkmalen (Bindungsisomere, Ringisomere) getrennt. Anhand charakteristischer Fragmente in den Elektronenstoßionisations-Spektren konnten auch solche Alkylmonoglucoside identifiziert werden, die nicht als Referenzmaterial vorhanden waren. Mit Hilfe eines Korrekturfaktors gelang mit dieser Methode auch die Quantifizierung des APG-Gehaltes in kosmetischen Erzeugnissen sowie Wasch- und Reinigungsmitteln.

Der Einsatz der massenspektrometrischen Detektion in Kopplung mit der Flüssigchromatographie (HPLC) beschleunigte die Entwicklung neuer Methoden. Eine weitere Screeningmethode, basierend auf der Fließinjektionsanalyse (FIA) konnte etabliert werden. Das Fragmentierungsverhalten der Quasimoleküle $[M-H]^+$ eignet sich zur Absicherung gefundener Ergebnisse. Bisher ist es aber nicht möglich anhand von Tochterionen-Spektren unbekannter Komponenten genaue Aussagen zu deren Stereochemie zu machen. Die Kopplung der RP-HPLC mit der Massenspektrometrie wurde erfolgreich zur Bestimmung von APG in Formulierungen eingesetzt. In Kombination mit der Festphasenextraktion (SPE) konnten Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1 µg/l erreicht werden.

Die saure Hydrolyse von APG hatte die Spaltung der Tenside zur Folge. Die freigesetzten Fettalkohole wurden mittels GC-FID analysiert. Das Spektrum der detektierten Alkohole spiegelt die Alkylkettenverteilung der untersuchten APG-Gemische sehr genau wider. Voraussetzung zur Analyse kosmetischer Proben war die Extraktion der APG aus ihrer komplexen Umgebung. Nach der SPE wurden die Proben an Kieselgel und Ionenaustauschermaterial gereinigt. Wie die Übereinstimmung der gefundenen Analysenergebnisse in kosmetischen Erzeugnissen zeigt, ist die Einführung von Korrekturfaktoren zur Berücksichtigung der Besonderheiten der einzelnen Analysenmethoden sinnvoll.

Neben dem Screening und der quantitativen Analyse einzelner Verbindungen bildete die Aufklärung unbekannter Komponenten einen weiteren Schwerpunkt in dieser Arbeit. Die Analyse technischer Gemische mittels MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laserdesorption/Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry) führte zum Nachweis von oligomeren Komponenten mit bis zu 10 Glucoseeinheiten im Molekül. Wichtigstes Instrument bei der Strukturaufklärung war die Kernresonanzspektroskopie (NMR). Nach der präparativen Anreicherung mittels SPE und nachfolgender HPLC-Fraktionierung wurden isolierte Isomere mittels ^1H - und ^{13}C -NMR untersucht. Dabei konnte n-Decyl- $\alpha(1\rightarrow6)$ Isomaltosid als eine der diglucosidischen Hauptkomponenten in Glucopon 225 identifiziert werden.

Danksagung

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Zeit von Januar 1997 bis Dezember 1999 am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin durchgeführt. Sie wurden mir durch die finanzielle Förderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 193 "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" ermöglicht.

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und die großzügige Unterstützung in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen.

Dr. T. Heberer, mein Betreuer während der Anfertigung meiner Diplomarbeit, hat mich bei der Einarbeitung in das Gebiet der Analyse nichtionischer Tenside jederzeit freundlich und uneigennützig unterstützt.

Mein Dank gilt allen Kooperationspartnern im Sfb 193 für die gute Zusammenarbeit. L. Orodovskaia und K. Schmitt danke ich für ihre wissenschaftlichen Beiträge zu dieser Arbeit. Mit ihrer umfangreichen praktischen Unterstützung wurde die Identifizierung von n-Decyl- α -Isomaltosid zu einem erfolgreichen Abschluß gebracht. Die Durchführung der erforderlichen Messungen wurde mir durch die BASF AG ermöglicht. In diesem Zusammenhang spreche ich meinen besonderen Dank W. Hock und R. Doetzer aus, unter deren Anleitung ich die notwendigen NMR-Messungen ausgeführt habe.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Arbeitskreis sei an dieser Stelle für die konstruktive und freundliche Arbeitsatmosphäre gedankt. Insbesondere möchte ich mich bei S. Klimmek bedanken, der mir jederzeit mit wertvollen Tipps bei Computerproblemen zur Seite stand. Die Hilfsbereitschaft und Fachkompetenz von C. Asmussen und U. Wippo haben mir meine Aufgabe sehr erleichtert. Darüberhinaus möchte ich mich bei Mr. R. Hatton für seine Hilfe bei der Korrektur der in englischer Sprache zur Veröffentlichung eingereichten Manuskripte bedanken. Der Erfahrungsaustausch mit D. Simmert und J. Meyer bei praktischen Problemen hat mir im Verlauf dieser Arbeit sehr geholfen.

Mein spezieller Dank gilt Dr. M. Erhard vom Max-Volmer-Institut für Biophysikalische Chemie und Biochemie der TU Berlin, unter dessen Anleitung die MALDI-TOF-Analysen durchgeführt worden sind. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei U. Grollmuß und T. Eckhardt bedanken, mit denen ich gemeinsam das Grundstudium absolviert habe und die bis heute stets ein offenes Ohr für alle wissenschaftlichen Probleme haben.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an meine Eltern, die mir durch ihre finanzielle Hilfe das Studium der Lebensmittelchemie erst möglich gemacht haben. Schließlich möchte ich mich auch bei meiner Ehefrau Ina bedanken, die für mich auch in schwierigen Zeiten ein starker Rückhalt war.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

A. Publikationen:

H.-J. Stan; T. Heberer; P. Billian:

Bestimmung von Fettalkoholethoxylaten in Trinkwasser.

Vom Wasser 90 (1998), 93-105

P. Billian; H.-J. Stan:

Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Alkylpolyglucosides as their Trimethylsilylethers.

Tenside Surfactants Detergents 35 (1998), 181-184

P. Billian; C. Asmussen; H.-J. Stan:

Analytik nichtionischer Tenside mittels LC-MS.

Schriftenreihe des Sfb 193 "Biologische Abwasserreinigung" zur "Anwendung der LC-MS in der Wasseranalytik" 1999, ISBN 3-7983-1796-8, 139-156

P. Billian; H.-J. Stan:

Quantitative determination of alkyl polyglucoside surfactants in cosmetics by means of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry.

J. Chromatogr. A (2000), eingereicht

P. Billian; W. Hock; R. Doetzer; H.-J. Stan; W. Dreher:

Isolation of n-decyl- α -isomaltoside from technical APG mixtures and its identification by the parallel use of LC-MS and NMR spectroscopy.

Anal. Chem. (2000), Publikation in Vorbereitung

B. Posterpräsentationen:

H.-J. Stan; P. Billian:

Nachweis von Alkylpolyglucosiden in tensidhaltigen Formulierungen.

Lebensmittelchemikertag in Berlin, 16.-18.09.1997

P. Billian; H.-J. Stan:

Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden.

Symposium "Tag der Tenside" in Leipzig, 30./31.03.1998

P. Billian; M. Erhard; H.-J. Stan:

Massenspektrometrische Untersuchungen von Alkylpolyglucosiden.

"Fortschritte für Wasch- und Reinigungsmittel" in Würzburg, 03./04.05.1999

P. Billian; M. Erhard; H.-J. Stan:

Investigations of Alkyl Polyglucosides by Means of Mass Spectrometry.

37th IUPAC Congress in Berlin, 14.-19.08.1999

C. Vorträge:

P. Billian; H.-J. Stan:

Bestimmung von Fettalkoholethoxylaten in Wasser.

Vortrag anlässlich der Regionalverbandstagung Nord/Nordost der GDCh,
28.02.1997 in Neubrandenburg

P. Billian; H.-J. Stan:

Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden in Kosmetika mittels
Kapillargaschromatographie/Massenspektrometrie.

Vortrag anlässlich der Regionalverbandstagung Nord/Nordost der GDCh,
20./21.04.1998 in Lüneburg

P. Billian; C. Asmussen; H.-J. Stan:

Analytik nichtionischer Tenside mittels LC-MS.

Vortrag anlässlich des Kolloquiums "Anwendung der LC-MS in der Wasseranalytik",
07./08.06.1999 in Berlin

Inhalt	
Abkürzungen	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Alkylpolyglucoside (APG)	2
1.2.1	Struktur und Herstellung	2
1.2.2	Anwendung von APG	5
1.2.3	Zum Stand der Analytik	7
2	Problemstellung und Lösungsansätze	12
3	Grundlagen der angewandten Analytik	14
3.1	Probenvorbereitung	14
3.2	Bestimmung des Gesamt organischen Kohlenstoffgehaltes (TOC)	15
3.3	Chromatographische Trennverfahren	15
3.3.1	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	16
3.3.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	16
3.3.3	Gaschromatographie (GC)	17
3.4	Detektorsysteme	19
3.4.1	Detektion in der HPTLC	19
3.4.2	Universelle Detektoren für HPLC und GC	20
3.4.2.1	Differentialrefraktometer (RI) und Lichtstreuendetektor (ELSD)	20
3.4.2.2	Flammenionisationsdetektor (FID)	20
3.4.3	Massenspektrometrie (MS)	21
3.4.3.1	Massenspektrometrie nach Elektronenstoßionisation (EI-MS)	21
3.4.3.2	Atmosphärendruck-Ionisations-Massenspektrometrie (API-MS)	22

3.4.3.3	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	24
3.4.4	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	24
4	Material und Methoden	26
4.1	Untersuchte Proben	26
4.1.1	Technische APG-Gemische	26
4.1.2	Analysen zum biologischen Abbau von Restkonzentraten	27
4.1.3	Schaumfraktionierung und Membranfiltration	28
4.1.4	Kosmetika und Waschmittel	28
4.2	Probenvorbereitung	30
4.2.1	Technische APG-Gemische	30
4.2.2	Fertigprodukte aus dem Handel	31
4.2.3	Isolierung von Alkyldiglucosiden	31
4.3	Bestimmung der Trockenmasse	32
4.4	Bestimmung des TOC-Gehaltes	32
4.5	Screeningmethoden zur schnellen Analyse von APG	33
4.5.1	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	33
4.5.2	Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion (FIA-MS)	34
4.6	Quantitative Bestimmung von Einzelkomponenten	35
4.6.1	Bestimmung von Alkylmonoglucosiden mittels GC-MS	35
4.6.1.1	Probenvorbereitung	35
4.6.1.2	Geräteparameter des GC-MS-Systems	36
4.6.1.3	Quantitative GC-MS-Analyse von Alkylmonoglucosiden	36
4.6.2	Bestimmung von APG mittels GC-FID nach Hydrolyse	38
4.6.2.1	Probenvorbereitung	38
4.6.2.2	Geräteparameter des GC-FID-Systems	38
4.6.2.3	Quantitative Bestimmung technischer APG-Gemische	39

4.6.3	Bestimmung von Mono- und Diglucosiden mittels HPLC-MS	39
4.6.3.1	Probenvorbereitung	39
4.6.3.2	Geräteparameter des HPLC-MS-Systems	40
4.6.3.3	Quantitative HPLC-MS-Analyse	41
4.7	Chemische Charakterisierung von Einzelkomponenten	41
4.7.1	MALDI-TOF-MS zum Nachweis von Alkyloligoglucosiden	41
4.7.2	Trennung von Stereoisomeren an Hypercarb S	42
4.7.3	Konformations- und Strukturanalyse mittels HPLC-MS/MS	43
4.7.4	Untersuchung von Glucopon 225 mittels HPLC- ¹ H-NMR	44
4.7.5	Strukturaufklärung mittels ¹ H- und ¹³ C-NMR	44
5	Ergebnisse und Diskussion	45
5.1	Bestimmung der Trockenmasse technischer APG-Gemische	45
5.2	TOC-Gehalt	45
5.3	Probenvorbereitung	47
5.3.1	Anwendung und Grenzen der Gefriertrocknung (GF)	47
5.3.2	Anreicherung von APG mittels Festphasenextraktion (SPE)	47
5.3.2.1	Sorbensauswahl	48
5.3.2.2	Optimierung der SPE-Bedingungen	49
5.3.2.3	Extraktion von APG aus Bioreaktorproben	51
5.4	Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)	54
5.4.1	Detektion von APG in der HPTLC	54
5.4.2	HPTLC-Trennung von APG auf Normal- und Umkehrphasen	56
5.5	Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion (FIA-MS)	61
5.5.1	Optimierung der Ionisationsbedingungen	61
5.5.2	Screening von Proben nach Anreicherung mit Membranfiltration	66
5.5.3	Quantifizierungen von APG in matrixarmen Proben	67
5.5.4	Tandem-Massenspektrometrie nach Fließinjektion (FIA-MS/MS)	68

5.6	Bestimmung von APG mittels GC-MS	72
5.6.1	Derivatisierung	73
5.6.2	GC-MS von APG-Trimethylsilyl-Derivaten	74
5.6.3	Quantifizierung von Alkylmonoglucopyranosiden mittels GC-MS	77
5.7	Analyse von APG mittels GC-FID	80
5.7.1	Chemische Hydrolyse von APG	80
5.7.2	Quantifizierung von APG mittels GC-FID	82
5.8	Flüssigchromatographische Analyse von APG	85
5.8.1	Einsatz universeller Detektoren in der HPLC-Analyse von APG	86
5.8.2	HPLC-MS-Bestimmung von APG	88
5.8.2.1	RP-HPLC-MS-Analyse von APG	88
5.8.2.2	Empfindlichkeit und Linearität	91
5.8.2.3	Quantitative Analyse von technischen APG-Gemischen	93
5.9	Chemische Charakterisierung von Einzelkomponenten	98
5.9.1	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	98
5.9.2	Bestimmung von APG an Hypercarb S	99
5.9.3	HPLC-MS/MS zur Charakterisierung von APG-Gemischen	101
5.9.4	Identifizierung von n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid	105
5.9.4.1	Präparative Anreicherung	105
5.9.4.2	Untersuchung von Glucopon 225 mittels HPLC- ^1H -NMR	109
5.9.4.3	Charakterisierung von n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid mittels ^1H - und ^{13}C -NMR	112
5.10	Bestimmung von APG in Fertigprodukten	117
5.10.1	Ermittlung der Trockenmasse	117
5.10.2	GC-MS-Analyse von APG in Fertigprodukten aus dem Handel	118
5.10.3	GC-FID-Analyse von APG in Fertigprodukten	121
5.10.4	Bestimmung von APG in Fertigprodukten mittels HPLC-MS	125

6	Zusammenfassung	131
7	Literatur	134

Anhang:	I.	Standardsubstanzen
	II.	Lösungsmittel/Chemikalien
	III.	Material

Abkürzungsverzeichnis

AEO	Fettalkoholethoxylat
AMD	Automated Multiple Development
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APG	Alkylpolyglucosid
API	Atmospheric Pressure Interface
BIAS	Bismutaktive Substanz
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
C1, C2, C8, C18	Methyl-, Ethyl-, Octyl, Stearyl
C8G1, C10G1...	Octyl-, Decyl-Monoglucosid
C8G2, C10G2...	Octyl-, Decyl-Diglucosid
C10- α -G1, C10- β -G1	Decyl- α -Monoglucosid, Decyl- β -Monoglucosid
CID	Collision Induced Decay
CE	Collision Energy (Kollisionsenergie)
COSY	Correlated Spectroscopy
DAP-Reagenz	Diphenylamin-Anilin-Phosphorsäure-Reagenz
DC	Dünnschichtchromatographie
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO-d6	Dimethyl-d6-sulfoxid (deutert)
dp	degree of polymerisation (Polymerisationsgrad)
EI	Elektronenstoßionisation
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Lichtstreuendetektor)
FIA	Fließinjektionsanalyse
FID	Flammenionisationsdetektor
GC	Gaschromatographie
GF	Gefriertrocknung
HP	Hewlett Packard
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HT-GC	Hochtemperatur-Gaschromatographie
i.D.	innerer Durchmesser
ISTD	interner Standard
Kap.	Kapitel
KGC	Kapillargaschromatographie

LLE	Liquid/Liquid Extraction (Flüssig/Flüssig-Extraktion)
M	Molekulargewicht
m/z	Masse eines Teilchens bezogen auf die Zahl seiner Elementarladungen
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laserdesorption/Ionization-Time of Flight
MCA	Multi Channel Acquisition
MRM	Multiple Reaktion Monitoring
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekülgewicht
NG	Nachweisgrenze
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NP	Normal Phase (Normalphase)
PC	Personalcomputer
PTFE	Polytetrafluorethylen
RI	Differentialrefraktometer
RIC	Reconstructed Ion Chromatogram
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
R _f	Retention factor
R _t	Retentionszeit
SDB	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer
SEC	Size Exclusion Chromatography (Größenausschlußchromatographie)
SF	Schaumfraktionierung
Sfb	Sonderforschungsbereich
SIM	Selected Ion Monitoring
SIR	Selected Ion Recording
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
TC	Total Carbon (Gesamtkohlenstoffgehalt)
TiC	Total inorganic Carbon (Gesamt anorganischer Kohlenstoffgehalt)
TIC	Totalionenchromatogramm
TMS-	Trimethylsilyl-
TOC	Total organic Carbon (Gesamt organischer Kohlenstoffgehalt)
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
WF	Wiederfindung

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Vereinfachte chemische Struktur von APG	2
Abbildung 1-2:	Chemische Struktur wichtiger Alkyldiglucoide	3
Abbildung 1-3:	Synthese von Ethylglucosid nach Fischer [1893]	4
Abbildung 5-1:	Vergleich der WF nach SPE mit unterschiedlichen Sorbentien	48
Abbildung 5-2:	Elutionsprofil ausgewählter APG bei der Extraktion mit ENV+	50
Abbildung 5-3:	Desorption von APG von der Oberfläche toter Biomasse mit verschiedenen Lösungsmitteln	53
Abbildung 5-4:	Farbreaktion nach Kakac und Veydelek [1974]	55
Abbildung 5-5:	NP-HPTLC technischer und kosmetischer Formulierungen - Detektion von Alkylpolyglucosiden mit DAP-Reagenz	58
Abbildung 5-6:	RP-HPTLC technischer und kosmetischer Formulierungen - Detektion von Alkylpolyglucosiden mit DAP-Reagenz	59
Abbildung 5-7:	Trennung von APG mittels RP-C18-HPTLC	60
Abbildung 5-8:	Trennung von Decyl-Diglucoiden mittels RP-C18-HPTLC	60
Abbildung 5-9:	Positives ESI-MS/MS-Spektrum von C12G1	61
Abbildung 5-10:	Einfluß der Cone-Spannung auf die Detektion von APG	63
Abbildung 5-11:	Bildung von Adduktionen in Abhängigkeit von der Cone-Spannung	64
Abbildung 5-12:	APCI-Massenspektrum von Plantacare 818 UP	65
Abbildung 5-13:	Veränderung des Alkylkettenspektrums von APG-Gemischen bei Anreicherung mittels Membranfiltration	66
Abbildung 5-14:	Kalibriergeraden einiger APG bei der FIA-MS-Analyse	67
Abbildung 5-15:	Einfluß der Kollisionsenergie auf die Fragmentierung von C10G2	69
Abbildung 5-16:	Vergleich der MS/MS-Spektren anomerer Alkylmonoglucoide	70
Abbildung 5-17:	MS/MS-Spektren von C8G2 und C8G3	71
Abbildung 5-18:	Vergleich der MS/MS-Spektren von C8H17G1 und C8D17G1	72
Abbildung 5-19:	Reaktion von Alkylmonoglucoiden mit BSTFA	74

Abbildung 5-20:	GC-EI-MS-Chromatogramm von Plantacare 818 UP	74
Abbildung 5-21:	EI-Massenspektren (70 eV) ausgewählter APG-TMS-Derivate	76
Abbildung 5-22:	Responsefaktoren ausgewählter APG gegenüber dem ISTD C7G1	78
Abbildung 5-23:	Bestimmung von Alkylmonoglucopyranosiden in technischen APG-Gemischen mittels GC-MS	79
Abbildung 5-24:	Einfluß des pH-Wertes auf die LLE von Fettalkoholen mit EtOAc	81
Abbildung 5-25:	GC-FID-Bestimmung von Plantacare 818 UP nach Hydrolyse	82
Abbildung 5-26:	Veränderung der Zusammensetzung technischer APG-Gemische durch die Anreicherung mittels Schaumfraktionierung	84
Abbildung 5-27:	Analyse von Glucosid 24 mittels RP-HPLC und RI-Detektion	87
Abbildung 5-28:	RP-C8-HPLC-MS-Analyse eines Standardgemisches (20 ng)	89
Abbildung 5-29:	TIC der RP-HPLC-Trennung anomerer APG (50 ng)	90
Abbildung 5-30:	SIR-Chromatogramme eines Standardgemisches (0,2 ng)	92
Abbildung 5-31:	Kalibrierkurven ausgewählter APG (10-200 ng)	93
Abbildung 5-32:	RP-C8-HPLC-MS-Analyse von Glucopon 225	94
Abbildung 5-33:	Alkylkettenspektren von Plantacare 818 UP	97
Abbildung 5-34:	MALDI-TOF-Massenspektrum von Glucopon 225	99
Abbildung 5-35:	Trennung von Glucopon 225 an Hypercarb S	100
Abbildung 5-36:	Trennung von oligomeren APG an Hypercarb S	100
Abbildung 5-37:	Identifizierung von Alkylmonoglucosiden mittels HPLC-MS/MS	102
Abbildung 5-38:	HPLC-MS/MS der Decyl-Diglucoside aus Glucopon 225	103
Abbildung 5-39:	Desorption von APG in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen - Wiederfindung von APG in der Methanolfraktion nach Elution mit verschiedenen Mengen Cyclohexan/Ethylacetat	107
Abbildung 5-40:	Glucopon 225 vor und nach Aufreinigung mittels Doppel-SPE	109
Abbildung 5-41:	HPLC- ¹ H-NMR-Analyse von Alkyl-Diglucosiden	110
Abbildung 5-42:	Nomenklatur von n-Dodecyl- α (1 \rightarrow 4) Maltosid	111
Abbildung 5-43:	¹ H-NMR-Spektrum von C12- α -G2	113

Abbildung 5-44:	HSQC-NMR-Spektrum (600 MHz) von C12- α -G2	114
Abbildung 5-45:	Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Referenzsubstanz C12- α -G2 und des Zielanalyten A	115
Abbildung 5-46:	n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid	116
Abbildung 5-47:	GC-MS-Analyse des Duschbades "Palmolive" nach Silylierung mit Tril Sil [®]	119
Abbildung 5-48:	GC-MS-Analyse des Duschbades "Nivea" nach Silylierung mit BSTFA	120
Abbildung 5-49:	GC-FID-Chromatogramm der APG im Duschbad "Tamara" nach Dotierung mit Plantacare 818 UP und Hydrolyse	123
Abbildung 5-50:	GC-FID-Chromatogramme der APG in den Waschmitteln Persil (A) und Perwoll (B) nach Hydrolyse	124
Abbildung 5-51:	RP-HPLC-MS-Analyse einer Badewasserprobe	126
Abbildung 5-52:	RP-HPLC-MS-Analyse der APG im Duschbad "Fa"	127

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Zusammensetzung von APG-Gemischen nach Hill et al. [1997]	2
Tabelle 1-2:	Produktverteilung nach Balzer und Ripke [1992]	3
Tabelle 1-3:	Ökotoxikologische Daten eines C ₁₂ /C ₁₄ -APG-Gemisches nach Steber et al. [1995]	6
Tabelle 1-4:	Übersicht zum Stand der Analytik von APG	11
Tabelle 4-1:	Technische Daten untersuchter APG-Gemische	26
Tabelle 4-2:	Inhaltsstoffe des Fa-Duschgels "Aqua"	29
Tabelle 4-3:	Getestete SPE-Materialien	30
Tabelle 4-4:	Analysenparameter der HPTLC-Bestimmung	33
Tabelle 4-5:	FIA-MS-System zur Bestimmung von APG	34
Tabelle 4-6:	GC-MS-System zur Bestimmung von Alkylmonoglucosiden	36
Tabelle 4-7:	GC-FID-System zur Bestimmung von Fettalkoholen	38
Tabelle 4-8:	Flüssigchromatographische Trennung von APG	40
Tabelle 4-9:	SIR-Detektion von APG	40
Tabelle 4-10:	HPLC zur Analytik stereoisomerer APG	42
Tabelle 4-11:	HPLC-MS/MS-Analyse von APG	43
Tabelle 5-1:	Bestimmung der Trockenmasse	45
Tabelle 5-2:	TOC-Gehalt der Trockenmasse technischer APG-Gemische (n=3)	46
Tabelle 5-3:	NP-HPTLC von APG mit verschiedenen Laufmittelgemischen	56
Tabelle 5-4:	Elutionsreihenfolge der APG-TMS-Derivate	75
Tabelle 5-5:	Fragmentierung von APG-TMS-Derivaten	77
Tabelle 5-6:	WF [%] technischer APG-Gemische nach HCl-Spaltung (n=3)	83
Tabelle 5-7:	HPLC-MS zur Quantifizierung von APG in technischen Gemischen	95
Tabelle 5-8:	Alkylkettenspektrum technischer APG-Gemische	97
Tabelle 5-9:	Wichtige Fragmente in den MS/MS-Spektren der mittels RP-C8-HPLC getrennten Decyl-Diglucoside	103

Tabelle 5-10:	Wichtige Fragmente in den MS/MS-Spektren an Hypercarb S getrennter Decyl-Diglucoside	105
Tabelle 5-11:	Trockenmasse analysierter Kosmetika und Waschmittel	118
Tabelle 5-12:	GC-MS-Analyse von Fertigprodukten aus dem Handel	121
Tabelle 5-13:	Analyse von Fertigprodukten mittels GC-FID	125
Tabelle 5-14:	APG-Gehalt in der Trockenmasse handelsüblicher Kosmetika	128
Tabelle 5-15:	Alkylkettenspektrum technischer und kosmetischer Erzeugnisse	129

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Alkylpolyglucoside (APG) stellen eine neue Generation nichtionischer Tenside dar, die sich in den letzten 10-15 Jahren weltweit etabliert hat. Aus ihrer stärkeren Beachtung in der jüngeren Vergangenheit, erstmalig wurden sie vor über 100 Jahren von Fischer [1893] beschrieben, erwächst ein zunehmendes Interesse an Analysemethoden, die ein schnelles und kostengünstiges Erfassen dieser Tenside sowohl in der Rohstoff- und Produktkontrolle als auch im Bereich der Abwasseruntersuchung erlauben.

Im Sonderforschungsbereich (Sfb) 193 "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) werden seit 1997 an der Technischen Universität Berlin Grundlagenkenntnisse über die Aufbereitung tensidhaltiger Spülwässer aus der Herstellung von nichtionischen Tensiden erarbeitet. Bisher gelangen diese Abwässer, die mit zum Teil erheblichen Tensidfrachten beladen sind, häufig völlig unbehandelt in die zentrale Abwasserreinigung. Die Belastung der kommunalen oder industriellen Kläranlagen wurde zwar durch die Entwicklung von biologisch weitgehend abbaubaren Tensiden dahingehend entschärft, daß die aus früheren Jahren bekannte Schaumberge auf Gewässern ausbleiben; die Art der "Entsorgung" kann jedoch kaum zufriedenstellen. Der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit lag in der Entwicklung von Analysemethoden zur chemischen Charakterisierung komplexer Gemische von Alkylpolyglucosiden.

In Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Prof. G.H. Findenegg; I.-N.-Stranski-Institut für Physikalische und Theoretische Chemie; Prof. U. Wiesmann; Institut für Verfahrenstechnik sowie Prof. G. Wozny; Institut für Prozeß- und Anlagentechnik wurden die Prozesse der Anreicherung von Alkylpolyglucosiden aus Spülwässern (Adsorption, Membranfiltration und Schaumfraktionierung) und der biologische Abbau von nicht verwertbaren Restkonzentrationen dieser Tenside analytisch begleitet. Neben ihrer summarischen Erfassung wurde das Verhalten einzelner APG-Komponenten analytisch verfolgt. Dazu wurden spezielle analytische Methoden entwickelt, mit deren Hilfe Proben auf das Vorhandensein von Alkylpolyglucosiden untersucht und identifizierte Einzelkomponenten auch im Spurenbereich quantifiziert werden konnten.

1.2 Alkylpolyglucoside (APG)

1.2.1 Struktur und Herstellung

Alkylpolyglucoside stellen nichtionische Tenside dar, die aus einem hydrophoben Molekülteil, dem linearen Alkylrest und einem hydrophilen Zuckeranteil bestehen (Abbildung 1-1). Der Alkylrest R, der glucosidisch am Glucoserest gebunden ist, weist bei Herstellung der APG auf Basis nachwachsender Rohstoffe eine gerade Anzahl an C-Atomen auf; seine Länge variiert zwischen 8 und 16 C-Atomen.

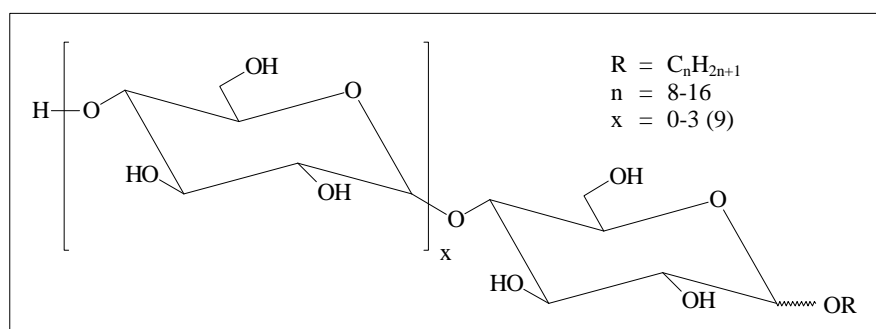


Abbildung 1-1: Vereinfachte chemische Struktur von APG

Die chemische Charakterisierung technischer APG-Gemische erfolgt über die Angabe der vorkommenden Alkylreste und über die Zahl der durchschnittlich an einen Alkylrest gebundenen Glucoseeinheiten (dp). Industriell hergestellte APG-Formulierungen weisen in der Regel einen Polymerisationsgrad zwischen 1,4 und 1,7 auf (Tabelle 1-1). Als Kurzbezeichnung lassen sich APG in der Form C_nG_m beschreiben, wobei m die Zahl der am Alkylrest gebundenen Glucoseeinheiten angibt.

Tabelle 1-1: Zusammensetzung von APG-Gemischen nach Hill et al. [1997]

Alkylkettenlänge		dp*	Handelsname
kurzkettig	C8/C10	1,5	Glucopon 215 CSUP
	C8/C10	1,5	Glucopon 220 DP
	C8/C10	1,7	Glucopon 225 DK
	C9/C11	1,6	Agrimul PG 2067
langkettig	C12/C14	1,4	Plantacare 1200 UP
Spezialprodukte	C8-C14		Plantacare 818 UP
	C8-C14		Plantacare 2000 UP

* dp - degree of polymerisation (Polymerisationsgrad).

Mit ~ 50 % stellen die Alkylmonoglucoside den größten Anteil der Trockenmasse, gefolgt von den Alkyldiglucosiden mit einem Gewichtsanteil von etwa 15 %. Die Tabelle 1-2 spiegelt eine typische Produktverteilung technischer APG-Gemische hinsichtlich der Verteilung der verschiedenen Glucosidierungsgrade wider. Mathematisch lässt sich die statistische Oligomerenverteilung nach Flory [1952] erklären.

Tabelle 1-2: Produktverteilung nach Balzer und Ripke [1992]

Zahl der Glucoseeinheiten m		(%)
1	Alkylmonoglucoside	40-65
2	Alkylmaltoside	11-17
3	Alkylmaltotrioside	2-10
>3	Oligoglucoside	15-30

Durch die Bildung von α - und β -Anomeren, pyranosiden und furanosiden Ringen, die über 1,2-, 1,3-, 1,4- und 1,6-Bindungen linear oder verzweigt miteinander verknüpft sein können, ergibt sich zusätzlich eine unüberschaubar große Zahl möglicher isomerer Strukturen. So lassen sich bei einem Alkyldiglucosid bereits mehr als 30 Isomere formulieren, von denen vier bedeutende in Abbildung 1-2 dargestellt sind.

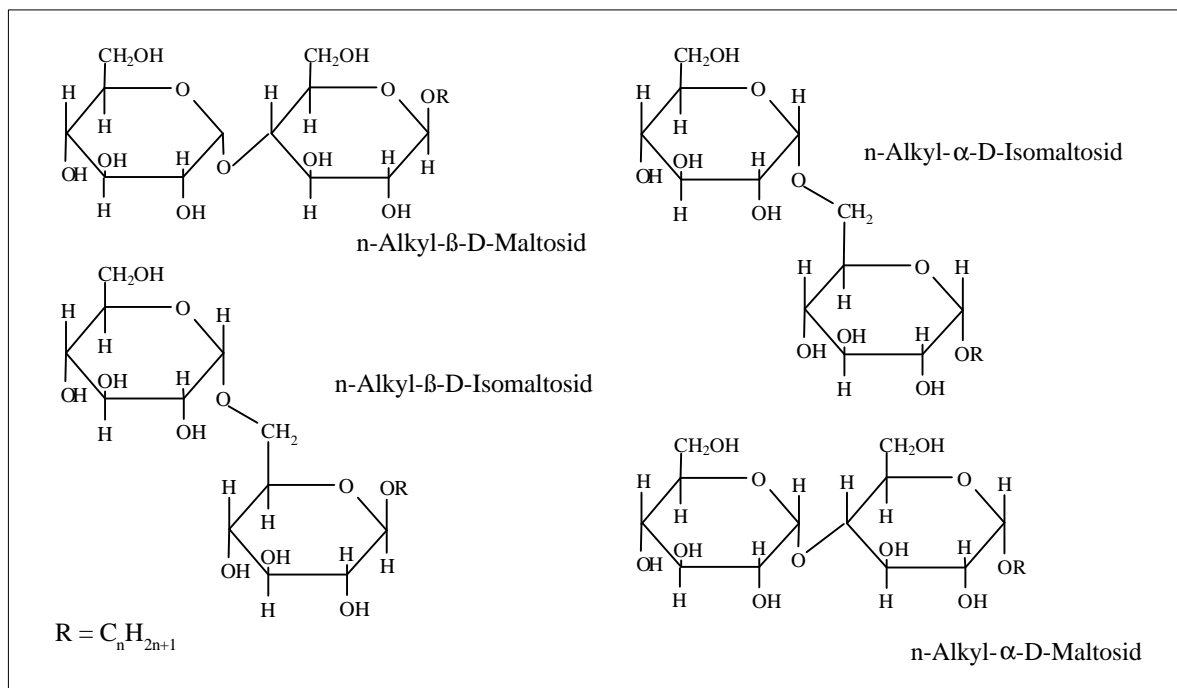


Abbildung 1-2: Chemische Struktur wichtiger Alkyldiglucoside

Bei mehr als zwei Glucoseeinheiten im Molekül sind bereits mehr als 100 stereoisomere Strukturen denkbar. Rein rechnerisch enthält ein APG-Gemisch mit nur zwei verschiedenen Alkylketten und einem angenommenen maximalen Glucosidierungsgrad von drei nur sechs homologe, gleichzeitig aber mehr als 1000 isomere Verbindungen!

Zu Beginn der 90er Jahre wurde mit der Entwicklung von technischen Formulierungen für die Anwendung von APG in Wasch- und Reinigungsmitteln sowie in Kosmetika begonnen. Nach anfangs mäßigem Interesse und einigen technischen Schwierigkeiten gelang der Henkel KGaA 1992 der endgültige Durchbruch mit der Inbetriebnahme einer Produktionsanlage in Cincinnati (USA). Derzeit werden weltweit etwa 80 000 t dieser Tenside produziert. Den größten Marktanteil besitzt Henkel mit einem Produktionsvolumen von ca. 50 000 t pro Jahr. Neben einem Standort in den USA wird seit 1995 eine Produktionsanlage in Düsseldorf betrieben [Henkel KGaA, 1997].

Die Herstellung von Alkylpolyglucosiden basiert auf der nach Emil Fischer benannten Fischer-Glycosylierung (Abbildung 1-3), einer sauer katalysierten Reaktion von Glucose mit Alkoholen [von Rybinski und Hill, 1998]. Im Verlauf einer Gleichgewichtsreaktion lagern sich die zunächst bevorzugten furanosiden Formen in die letztlich vorherrschenden pyranosiden Verbindungen um. Durch die Polyfunktionalität der Glucose entstehen bei der Reaktion von Glucose mit Alkoholen neben den Alkylmonoglucosiden auch Reaktionsprodukte mit zwei oder mehr Glucoseeinheiten im Molekül.

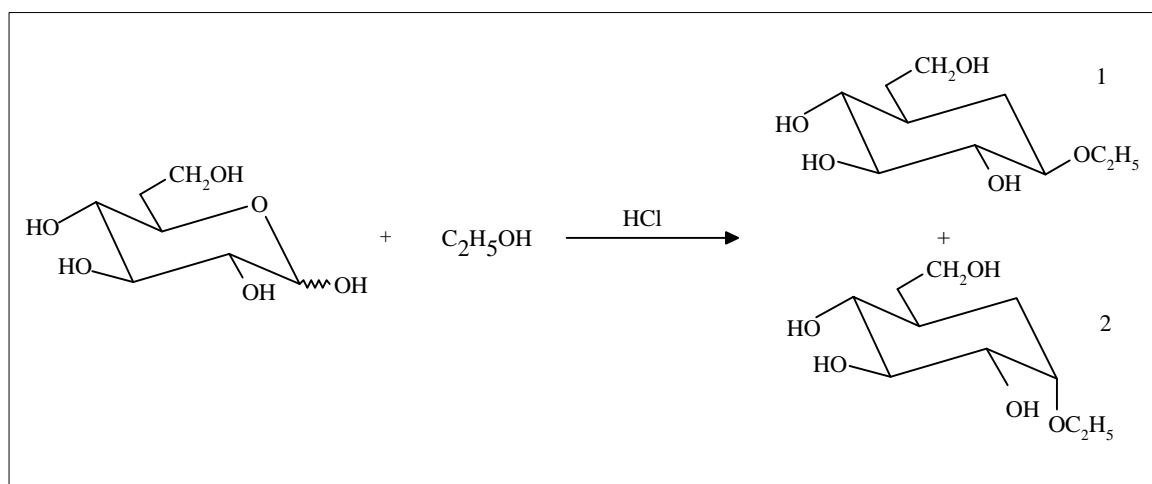


Abbildung 1-3: Synthese von Ethylglucosid nach Fischer [1893]

1 = Ethyl-β-D-Monoglucopyranosid, 2 = Ethyl-α-D-Monoglucopyranosid

Grundsätzlich lassen sich zwei industrielle Synthesewege für APG unterscheiden. Als Direktsynthese wird ein einstufiges Verfahren bezeichnet, bei dem Glucose in Fettalkohol suspendiert und in Gegenwart eines sauren Katalysators, häufig sind es Sulfonsäurederivate [Böge und Tietze, 1998], bei etwa 100°C umgesetzt wird. Der Fettalkohol ist entweder petrochemisch zugänglich oder wird aus Fetten und Ölen (Kokos- oder Palmkernöl) nach der Fettspaltung und Hydrierung der Fettsäuremethylester gewonnen.

Neben den gewünschten Alkylpolyglucosiden entstehen oftmals auch unerwünschte Nebenprodukte wie Glucosepolymere und farbige Verunreinigungen, deren Art und Konzentration durch die Reaktionsbedingungen wie Druck, Temperatur oder Katalysatortyp beeinflusst werden kann. Über das Verhältnis von eingesetztem Kohlenhydrat zu Fettalkohol läßt sich das Verhältnis zwischen Alkylmonoglucosiden und Alkyloligoglucosiden und damit die Hydrophilie des komplexen Produktgemisches steuern und den anwendungstechnischen Erfordernissen anpassen [von Rybinski und Hill, 1998].

Beim zweistufigen Verfahren wird Glucosesirup in einem ersten Schritt säurekatalysiert mit n-Butanol umgesetzt. Anschließend erfolgt eine Umacetalisierung mit längerkettigen Fettalkoholen. Dem erhöhten apparativen Aufwand stehen geringere Kosten für die eingesetzten Rohstoffe gegenüber. Beiden Synthesewegen gemeinsam ist die Bildung komplexer Gemische von verschiedenen homologen und isomeren APG, während stereoselektive Synthesen definierte Verbindungen liefern [Focher et al., 1990; Matsumara, 1990; Tietze et al., 1994].

Die großtechnische Synthese endet mit der Neutralisation des sauren Katalysators. Der Überschuß an nicht umgesetztem Fettalkohol wird destillativ entfernt. In einem letzten Schritt wird das als Folge von Karamelisierungsreaktionen oftmals bräunlich gefärbte APG-Gemisch einer Bleichung unterzogen.

1.2.2 Anwendung von APG

Nachdem es zu Beginn der 90er Jahre gelungen ist, großtechnisch hergestellte APG zu einem wettbewerbsfähigen Preis auf den Markt zu bringen und gleichzeitig die anfangs mangelhafte Qualität deutlich zu verbessern, nahm die Entwicklung von Produktformulierungen mit APG stetig zu [Kahre und Tesmann, 1995]. Hauptgrund hierfür sind einige sehr interessante anwendungsbezogene Eigenschaften und das herausragende ökotoxikologische Verhalten dieser Zuckertenside.

Die Herstellung von APG auf der Basis nachwachsender Rohstoffe bietet ideale Marketingmöglichkeiten. Der zunehmend umweltbewußte Verbraucher ist mit Begriffen wie "nachwachsend", "pflanzlich" oder "biologisch abbaubar" leicht für neue Produkte zu begeistern. Generell läßt sich feststellen, daß APG aus ökologischer Sicht eine verhältnismäßig angenehme Klasse nichtionischer Tenside darstellen. Bei ihrem Einsatz in Wasch-, Spül- und Reinigungsmitteln sowie in kosmetischen Formulierungen gelangen die Tenside nach der Anwendung ins Abwasser. Die Frage des Verbleibs ist eng mit der biologischen Abbaubarkeit verknüpft. In zahlreichen Versuchsreihen konnte nachgewiesen werden, daß APG schnell und vollkommen rückstandsfrei abgebaut werden. Steber et al. [1995] zeigen, daß APG sowohl im terristischen als auch im aquatischen Milieu keine Gefährdung für die Umwelt darstellen. Es konnten keine kritischen Aspekte beobachtet werden (Tabelle 1-3). Die überaus positive Risikoeinschätzung führte zur Einstufung der APG als erster Klasse nichtionischer Tenside in die Wassergefährdungsklasse 1 [Kahre und Tesmann, 1995].

Tabelle 1-3: Ökotoxikologische Daten eines C₁₂/C₁₄-APG-Gemisches nach Steber et al. [1995]

Test	Bewertungsparameter	
Akute Toxizität		
Fisch (96 h)	Mortalität LC 50	3 mg/l
Algen (72 h)	Zellvermehrung E ₆ C 50	6 mg/l
Subchronische/Chronische Toxizität		
Fisch (4 Wochen)	Wachstum NOEC	1,8 mg/l
Algen (72 h)	Zellvermehrung NOEC	2 mg/l
Terristische Toxizität		
Regenwurm (2 Wochen)	Mortalität LC 0	654 mg/kg
Hafer (14 d)	Wachstum NOEC	654 mg/kg

Alle Gehaltsangaben beziehen sich auf die Aktivsubstanz.

Für die Anwendung in Produktformulierungen spielen weitere Faktoren eine wichtige Rolle. Ausgeprägte Synergismen mit anionischen Tensiden führen zu einer Herabsenkung des Gesamtwirkstoffgehaltes in Wasch- und Reinigungsmitteln bei gleicher Produktleistung. Die Rahmenrezepturen APG-haltiger Feinwaschmittel enthalten bei gleicher Waschkraft gegen fetthaltige Anschmutzungen etwa 20 % weniger waschaktive Substanzen als vergleichbare Produkte ohne APG [Andree und Middelhaue, 1991]. Damit wird der Eintrag von Tensiden pro Anwendung reduziert, die Umweltbelastung sinkt.

Von großer Bedeutung ist die im Verhältnis zu anderen nichtionischen Tensiden hohe Schaumaktivität, die APG für den Einsatz in Handgeschirrspülmitteln interessant macht [Balzer und Ripke, 1992]. Schaum spielt bei der subjektiven Beurteilung eine große Rolle und erleichtert im Reinigungsvorgang die Verteilung des Produktes. Die Einstellung eines hautneutralen pH-Wertes in APG-haltigen Produkten hat keinen Verlust an Schaumstabilität und Reinigungsleistung zur Folge.

Seit einigen Jahren werden APG zunehmend für die Formulierung von kosmetischen Erzeugnissen verwendet. Typische Produkte, in denen APG als wertgebende Bestandteile vorkommen, sind Dusch- und Schaumbäder sowie Haarpflegepräparate. Pflegende Eigenschaften gegenüber strapaziertem Haar konnten in umfassenden Halbseitentests nachgewiesen werden [Kahre und Tesmann, 1995]. Der Einsatz in kosmetischen Erzeugnissen setzt eine sehr gute dermatologische Verträglichkeit von APG voraus. Im Ellenbeugenwaschtest konnten Busch et al. [1993] zeigen, daß die Erythrembildung einer Mischung aus Natriumlaurylethersulfat mit Plantaren 2000, ein APG-Gemisch der Henkel KGaA, etwa 30 % unter der Erythrembildung von reinem Natriumlaurylethersulfat liegt. Die sensorische Beurteilung der Versuchspersonen ergab eine durchweg positive Beurteilung des Gemisches aus APG und Fettalkoholethersulfat.

Die breite Anwendungspalette, beispielsweise werden APG auch bei der Herstellung von Pestizidformulierungen für die Landwirtschaft eingesetzt [Garst, 1997], zeigt, daß APG multifunktionelle Rohstoffe darstellen. Ihre Einsatzkapazität wird erst in den nächsten Jahren den vollen Umfang erreichen.

1.2.3 Zum Stand der Analytik

Mit zunehmender Bedeutung der APG als Bestandteil von Produktformulierungen wuchs auch das Interesse an analytischen Methoden für eine unkomplizierte und schnelle Bestimmung der Tenside im Rahmen der Rohstoff- und Produktkontrolle. Der Eintrag zehntausender Tonnen von APG über das Abwasser in die aquatische Umwelt verlangt eine sorgsame Kontrolle über den Verbleib der Tenside, erinnert sei an dieser Stelle noch einmal an die Schaumberge früherer Jahre auf unseren Seen und Gewässern.

Am Beginn dieser Arbeit waren nur sehr wenige analytische Methoden zur Bestimmung von APG bekannt. Weil APG so komplexe Gemische darstellen, wurde eine analytische Beschreibung sehr lange als kaum realisierbar angesehen. Balzer und Ripke [1992] haben technische APG-Gemische deshalb noch mit physikalischen Meßmethoden charakterisiert.

Obwohl physiko-chemische Untersuchungen gezeigt haben, daß einzelne Isomere zum Teil erhebliche Unterschiede in ihren Eigenschaften aufweisen [Balzer, 1991] und die chemische Analytik leistungsfähige chromatographische Trennmethoden und spektroskopische Meßmethoden bereithielt, war keine geeignete Methode zur chemischen Charakterisierung von Einzelkomponenten technischer APG-Gemische bekannt. In einem der Standardwerke der Tensidanalytik "Analysis of Surfactants" von Schmitt [1992] sind APG aufgrund fehlender Publikationen gar nicht erwähnt.

Erst auf das Interesse für eine Analytik von Produktformulierungen folgten einige wenige Veröffentlichungen. So haben Buschmann und Wodarczak [1995] eine photometrische Methode vorgestellt, die eine summarische Erfassung von APG nach der Umsetzung mit Anthronreagenz erlaubt. Wie die Untersuchung verschiedener Kosmetika zeigte, waren nur in Ausnahmefällen Interferenzen mit anderen Inhaltsstoffen zu beobachten. Eine Einzelkomponentenanalytik war mit dieser Methode nicht möglich. Die summarische Erfassung als bismutaktive Substanz (BIAS), die bei Screeningtests zur Untersuchung des Primärabbaus von nichtionischen Tensiden üblicherweise eingesetzt wird, scheitert bei APG.

APG stellen den analytischen Chemiker vor eine Reihe von Problemen. Neben ihrer komplexen Zusammensetzung weisen technische APG-Gemische eine breite Variabilität in der Hydrophilie der einzelnen Verbindungen auf. Man findet in technischen APG-Gemischen sowohl apolare Komponenten wie z.B. langkettige Alkylmonoglucoside als auch höher glucosidierte Verbindungen mit einer deutlich ausgeprägteren Hydrophilie. Eine komplette Einzelkomponentenanalytik, die lediglich auf einem chromatographischen Trennprinzip beruht, ist unwahrscheinlich. Die gaschromatographische Trennung derivatisierter APG mit anschließender Flammenionisationsdetektion (FID) unterstreicht diese Problematik. So gelang Spilker et al. [1996] die Trennung von Trimethylsilylderivaten nach Alkylrest und Glucosidierungsgrad. Eine Auftrennung verschiedener isomerer Strukturen wie Anomere und Ringisomere wurde beobachtet. Es muß jedoch festgehalten werden, daß mit Zunahme des Glucosidierungsgrades die Trennung der Einzelkomponenten dramatisch schlechter wurde. Die Gaschromatographierbarkeit höher molekularer Verbindungen sinkt wegen der abnehmenden Flüchtigkeit der Derivate, eine Diskriminierung der polareren Komponenten (Alkyldiglucoside oder Alkyloligoglucoside) kann nicht ausgeschlossen werden.

Die Flüssigchromatographie (HPLC) an Normal- und Umkehrphasen bietet sich als Alternative zur Trennung der verschiedenen Einzelkomponenten an. Hierbei wird lediglich vorausgesetzt, daß sich die APG im eingesetzten Eluenten vollständig lösen. Die fehlende

UV-Aktivität infolge fehlender chromophorer Gruppen hat zur Folge, daß der in der Routineanalytik weit verbreitete UV-VIS-Detektor zur Bestimmung underivatisierter APG nicht eingesetzt werden kann. So detektierten Bruns et al. [1989] APG nach der Trennung an einer C8-Umkehrphase mit einem Evaporative Light Scattering Detector (ELSD), der nach dem Verdampfen des Eluenten die Streuung von eingestrahltm Licht an den unverdampften APG-Molekülen registrierte. Mengerink et al. [1991] setzten diesen Detektortyp zur Analyse oligomerer Tenside ein. Die fehlende Selektivität läßt einen Einsatz bei der Untersuchung realer, matrixreicher Proben wie Kosmetika jedoch kaum zu. Ähnliche Schwierigkeiten ergaben sich bei der Detektion mit dem Differentialrefraktometer [Buschmann und Kruse, 1995]. Dieser Detektortyp ist ungeeignet für den Einsatz von Lösungsmittelgradienten in der HPLC. Zudem sind nur jene Verbindungen über einen Vergleich der Retentionsdaten zu identifizieren, die als Referenzmaterial vorhanden sind. Der Nachweis und die Quantifizierung bleibt somit auf wenige Analyten beschränkt.

Während in der Rohstoffanalytik überwiegend gaschromatographische und flüssig-chromatographische Methoden zur chemischen Charakterisierung eingesetzt wurden, erfolgte der Nachweis der Tenside in der Fertigproduktanalytik lange Zeit mit dünnschichtchromatographischen (DC)-Techniken [Waldhoff et al., 1997]. Durch das Besprühen mit verschiedenen Anfärbereagenzien gelang es, Matrixeffekte zu reduzieren. Handelsprodukte konnten schnell und einfach qualitativ auf ihre Inhaltsstoffe und somit auf APG überprüft werden. Wegen der Vielzahl an Inhaltsstoffen und der damit verbundenen Peaküberlagerungen, war die Auswertung oftmals jedoch auf semiquantitative Aussagen beschränkt.

Die Verwendung von hochauflösenden Dünnschichtplatten (HPTLC-Platten) verbesserte die Trennung der einzelnen Komponenten. In Kombination mit der automatischen Mehrfachentwicklung der HPTLC-Platten haben Klaffke et al. [1999] erfolgreich pulverförmige Waschmittel analysiert und den Gehalt an APG bestimmt.

Parallel zu chromatographischen Methoden wurden APG-Gemische auch enzymatisch untersucht [Kroh et al., 1999]. Aus der freigesetzten Glucose wird der Aktivsubstanzgehalt errechnet. Die Bestimmung realer Proben erwies sich als schwierig, die Aktivität der Enzyme wird offenbar durch andere Inhaltsstoffe gehemmt. Diese Methode bietet aber die Möglichkeit über die Selektivität der eingesetzten Enzyme Aussagen über die chemische Struktur der APG-Moleküle zu treffen.

Einen umfassenden Überblick über Methoden zur chemischen Charakterisierung von APG gibt Tabelle 1-4. Die Anwendung der Hochtemperatur-Gaschromatographie (HT-GC), die

von ihrem Trennvermögen her die leistungsstärkste der aufgeführten analytischen Methoden ist, wird durch eine sinkende Flüchtigkeit höher glucosidierter APG limitiert. DC- und HPLC-Verfahren weisen keine derartige Einschränkung auf. Neben der geringeren chromatographischen Trennkraft treten aber Probleme bei der Detektion der Tenside auf. Die Identifizierung ist zumeist nur für Substanzen möglich, die als Referenzmaterial vorliegen.

Unselektive Detektoren (FID oder ELSD) machen eine eindeutige Identifizierung unbekannter Analyten und ihrer Stereochemie nahezu unmöglich. Die Zuordnung unbekannter Verbindungen kann über typische Peakmuster erfolgen. So beschreiben Spilker et al. [1996] die charakteristische 2:1-Verteilung von α - und β -Anomeren. Ohne über Vergleiche zu verfügen, war es ihnen möglich, den gaschromatographisch getrennten Verbindungen ihre anomeren Strukturen zuzuordnen.

Die Entwicklung leistungsfähiger Ionenquellen und die damit zu realisierende Kopplung der Massenspektrometrie mit der Flüssigchromatographie beschleunigte in den vergangenen Jahren die Entwicklung neuer Methoden zur Bestimmung von APG. Facino et al. [1995] beschrieben erstmals die massenspektrometrische Detektion von APG nach Fließinjektion (FIA-MS). Anhand des Molekulargewichtes der jeweiligen Komponente gelang die direkte Identifizierung der APG auch in komplexen Gemischen ohne vorherige Chromatographie. Schreiber et al. [1998] zeigten, daß die hohe Selektivität der massenspektrometrischen Detektion die direkte Identifizierung und sogar Quantifizierung selbst in stark verunreinigten Klärwerksproben erlaubt. Die Absicherung der gefundenen Ergebnisse erfolgte über eine Fragmentierung der detektierten Ionen durch eine Erhöhung der Linsenspannung. Eine Unterscheidung von isomeren Verbindungen läßt die Fließinjektionsanalyse nicht zu. Klaffke et al. [1999] ionisierten flüssigchromatographisch getrennte APG-Komponenten in einem Atmospheric Pressure Ionization (API)-Interface. Probleme bereiteten hier wie auch bei Eichhorn und Knepper [1999] entstehende Adduktionen.

In seinem Übersichtsartikel zeigt Di Corcia [1998] die gesamte Leistungsstärke der HPLC-MS-Kopplung bei der Charakterisierung von Tensiden auf.

Die Anreicherung von APG spielte lange Zeit überhaupt keine Rolle. Die Bestimmung der Tenside im Rahmen der Rohstoff- und Produktanalytik war auf Grund der hohen Konzentrationen nicht an eine Extraktion geknüpft. Erst mit der Untersuchung von Abwässern auf den Verbleib von APG wurde eine Anreicherung zur Analyse der Verbindungen und möglicher Metaboliten des biologischen Abbaus notwendig. Die direkte Anwendung der Flüssig/Flüssig-Extraktion stößt bei Tensiden auf erhebliche

Schwierigkeiten, dagegen lassen sich APG wie alle nichtionischen Tenside mittels Festphasenextraktion aufkonzentrieren. Während Steber et al. [1995] auf die Extraktion der APG mit C-18-Adsorbens setzten, stellten Wodarczak und Burford [1998] einen kompletten Trennungsgang vor, der auf einer mehrstufigen Extraktion der wäßrigen Probe beruht. Die APG werden zunächst mit C-18-Material angereichert. Im Anschluß werden mitextrahierte Begleitstoffe durch weitere Aufreinigungsschritte an Kieselgel und Ionenaustauschermaterial entfernt. Mittels HPLC-ELSD gelang ihnen so der Nachweis von APG in komplexem Abwasser im Konzentrationsbereich von wenigen Milligramm pro Liter.

Insgesamt bleibt aber festzuhalten, daß es unbefriedigend ist, wenn technische Produkte, die im Maßstab von mehreren 10 000 t produziert werden und durch den Einsatz in Kosmetika direkt in Kontakt mit dem Menschen treten, in ihrer Zusammensetzung zum Teil unbekannt sind. Es gilt Methoden zu entwickeln, mit deren Hilfe die komplex zusammengesetzten Gemische möglichst umfassend definiert werden können. Für den Umweltbereich scheint es erforderlich, die Nachweisgrenzen auf Bereiche um 1 µg/l zu senken, wie sie in realen Abwasserproben erwartet werden [Waldhoff et al., 1997]. Im Rahmen der Fertigproduktanalytik sollten die Methoden auf ein breiteres Spektrum an Erzeugnissen angepaßt werden.

Tabelle 1-4: Übersicht zum Stand der Analytik von APG

Methode	
HT-GC-FID	Steber et al. [1995], Spilker et al. [1996], Waldhoff et al. [1997]
HPLC-RI	Buschmann und Kruse [1995], Spilker et al. [1996], Klaffke et al. [1998]
HPLC-ELSD	Bruns et al. [1989], Wodarczak und Burford [1998]
HPLC-MS	Klaffke et al. [1999], Eichhorn und Knepper [1999]
FIA-MS*	Facino et al. [1995], Schreiber et al. [1998]
HPTLC	Spilker et al. [1996], Klaffke et al. [1998]
MALDI-TOF-MS**	Hammes et al. [1997]
NMR	Spilker et al. [1996]
Photometrie	Buschmann und Wodarczak [1995]
Enzymatische Hydrolyse	Kroh et al. [1999]

* FIA: Flow Injection Analysis.

** MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry.

2 Problemstellung und Lösungsansätze

Die vorliegende Arbeit entstand im Teilprojekt E2 des Sfb 193 "Abwässer mit Tensiden". Der Projektbereich E beschäftigt sich seit 1997 mit der Behandlung von Abwässern aus der Herstellung nichtionischer Tenside. Neben Fettalkoholethoxylaten (AEO), der mengenmäßig bedeutendsten Klasse der nichtionischen Tenside, standen dabei Alkylpolyglucoside (APG) im Mittelpunkt der gemeinsamen Untersuchungen. Ziel des gesamten Projektbereiches E war die Anreicherung der Tenside aus den Spülwässern ihrer Herstellung. Sowohl die dabei gewonnenen Tensidkonzentrate als auch das gereinigte Abwasser sollten einer Wiederverwendung zugeführt werden. Während sich der Teilbereich E1 mit der adsorptiven Anreicherung an porösen Gläsern beschäftigte, wurden im Teilprojekt E4 Versuche zur Anreicherung an unterschiedlichen Membransystemen unternommen. Als weiterer Lösungsansatz wurde die Schaumfraktionierung auf ihre Eignung zur Aufkonzentrierung der nichtionischen Tenside aus dem Abwasser getestet. Im Rahmen meiner Arbeit sollten Analysenmethoden entwickelt werden, mit denen die bei den Kooperationspartnern anfallenden Proben hinsichtlich des Vorhandenseins von APG chemisch charakterisiert werden können. Auffällige Proben waren auf ihre genaue Zusammensetzung zu untersuchen, um Rückschlüsse auf bestimmte Eigenschaften und das daraus resultierende Verhalten zu ermöglichen.

Das Ziel der ersten Projektphase bestand in der Ausarbeitung einfacher Bestimmungsmethoden für APG. Dabei wurden Erfahrungen, die in der Vorbereitungsphase des Projektbereiches E gesammelt worden sind, genutzt. Mit der Etablierung einer dünnschichtchromatographischen Methode konnten anfallende Proben schnell und unkompliziert auf die Anwesenheit von APG untersucht werden. Schon früh wurde aber deutlich, daß es unrealistisch ist, sämtliche Fragestellungen in Bezug auf Screening, Quantifizierung und Strukturaufklärung mit nur einer Analysenmethode beantworten zu wollen. Ein ganzes Paket an analytischen Verfahren war notwendig, um neben der Identifizierung von Einzelkomponenten diese auch im Spurenbereich sicher quantifizieren zu können. Hinweise aus der Literatur ließen positive Ergebnisse bei der Entwicklung von zuverlässigen DC-, HPLC- und auch HT-GC-Methoden erwarten.

Die Beschaffung eines HPLC-MS/MS-Gerätes durch den Sfb 193 bedeutete einen großen Sprung in der Methodenentwicklung. Unter Ausnutzung der hohen Selektivität und Sensitivität der MS-Detektion wurde ein weiteres Screeningverfahren entworfen, mit dem in

kürzester Zeit Informationen über die Zusammensetzung von APG-haltigen Proben erhalten werden können.

Die Kopplung der MS-Detektion mit der HPLC wurde erfolgreich zur Bestimmung des Gehaltes verschiedener APG-Komponenten in technischen Gemischen eingesetzt. Zum Nachweis und zur Identifizierung unbekannter Metaboliten wurden im Rahmen dieser Arbeit HPLC-MS/MS-Methoden etabliert.

Die Ausarbeitung von Anreicherungsverfahren, basierend auf dem Prinzip der Festphasenextraktion sollte eine nochmalige Steigerung der Empfindlichkeit bewirken, nachdem in der Anfangsphase die Gefriertrocknung zur Aufkonzentrierung der Tenside eingesetzt wurde.

Nach Abschluß der Entwicklung der analytischen Grundlagen wurden die gewonnenen Erfahrungen auf reale Proben übertragen. Insbesondere die Untersuchung von Proben aus dem biologischen Abbau von Restkonzentraten machte eine Weiterentwicklung der bis dahin gebräuchlichen Anreicherungsverfahren notwendig. Die Adsorption der APG an der Biomasse und das geringe Konzentrationsniveau erwiesen sich als äußerst hinderlich bei der Bestimmung der Tenside. Ein weiterer Schwerpunkt der zweiten Projektphase war die Übertragung ausgearbeiteter Analysenmethoden auf den Bereich der Kosmetika und Waschmittel. Die Vielzahl an vorkommenden Inhaltsstoffen erforderte eine zusätzliche Aufreinigung kosmetischer Proben. Eine mehrstufige Festphasenextraktion wurde entwickelt, um störende Begleitstoffe zu entfernen.

Mit den entwickelten Methoden war es möglich, die Mehrzahl der Fragen aus den kooperierenden Teilprojekten zu beantworten. Wie sich im Verlauf dieser Arbeit jedoch herausstellte, bleibt die vollständige chemische Charakterisierung von technischen APG-Gemischen eine schwierige Aufgabe. Untersuchungen mittels Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) führten zum Nachweis von oligomeren APG in technischen APG-Gemischen. In Glucopon 225 wurden APG-Komponenten mit bis zu zehn Glucoseeinheiten im Molekül identifiziert.

In Zusammenarbeit mit der BASF wurden schließlich flüssigchromatographisch getrennte Alkyldiglucoside mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) analysiert, dabei gelang die Identifizierung eines bis dahin unbekannten Stereoisomers.

3 Grundlagen der angewandten Analytik

3.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist ein integraler Bestandteil analytischer Methoden. Ziel ist die selektive Anreicherung der zu untersuchenden Substanzen, gleichzeitig soll der Einfluß störender Matrix reduziert werden.

Die Festphasenextraktion (SPE) hat sich als leistungsstarke Probenvorbereitungsmethode in der Analytik von Umweltkontaminanten etabliert. Sie basiert auf Wechselwirkungen der Analyten mit dem Adsorbens. Die Analyten werden über polare, hydrophobe oder ionische Wechselwirkungen an der Oberfläche adsorbiert. Eluiert werden die nachzuweisenden Verbindungen mit einem organischen Lösungsmittel.

Für die SPE steht eine Vielzahl an Adsorbentien zur Verfügung. In der Rückstandsanalytik von Pestiziden in Lebensmitteln haben sich dabei insbesondere RP-C18-Materialien bewährt, bei denen die Kieselgeloberfläche mit Octadecylgruppen belegt ist [Newsome und Collins, 1989; Vahl et al. 1998]. Die Analyten werden aufgrund von Van-der-Waals-Wechselwirkungen retardiert. Daneben kommen auch Umkehr-Phasen, die kürzere Alkylketten (C2, C8) oder Phenylreste tragen, zur Anwendung, um apolare Substanzen anzureichern. Polare Verbindungen lassen sich an Cyanopropyl- oder Aminopropylphasen infolge polarer Wechselbeziehungen extrahieren. Zusätzlich zu diesen, auf Kieselgel basierenden Materialien gibt es graphitierte Ruße und Festphasen auf Polymerbasis. Styrol-Divinylbenzol (SDB)-Copolymere besitzen eine hohe Kapazität und eignen sich sowohl zur Extraktion polarer als auch apolarer Verbindungen.

Nach der Konditionierung werden die wäßrigen Proben durch die SPE-Kartuschen gesaugt. Dem Spülschritt folgt das Trocknen der Kartuschen. Eluiert werden die Analyten mit kleinen Volumina eines geeigneten organischen Lösungsmittels. Der große Vorteil der SPE gegenüber der klassischen Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) ist der geringe Lösungsmittelverbrauch. Zudem ist der Analytiker durch die Wahlmöglichkeiten hinsichtlich der Festphase und des Elutionsmittels flexibler als bei der LLE-Methode, die nur auf dem Prinzip des Verteilungsgleichgewichtes beruht. Die SPE bietet die Möglichkeit, gleichzeitig anzureichern und über den Waschschrift Matrix zu entfernen. Außerdem müssen keine Emulsionen befürchtet werden.

Alternativ zur SPE lassen sich APG auch mittels Gefriertrocknung aufkonzentrieren. Dabei wird die tiefgefrorene Probe im Hochvakuum getrocknet, das Lösungsmittel sublimiert. Mit Aufnahme des Lyophilisates in einem geeigneten Lösungsmittel besteht die Möglichkeit der Reduzierung von Matrixeffekten, wenn die Löslichkeit der Begleitstoffe im gewählten Lösungsmittel eingeschränkt ist.

3.2 Bestimmung des Gesamt organischen Kohlenstoffgehaltes (TOC)

Der TOC bezeichnet den organisch gebundenen Kohlenstoff gelöster und ungelöster Probenbestandteile. Die summarische Erfassung des organischen Anteils läßt Rückschlüsse auf Verunreinigungen der APG-Gemische mit anorganisch gebundenem Kohlenstoff und anderen anorganischen, salzartigen Bestandteilen zu. Grundlage der TOC-Bestimmung ist die Oxidation der kohlenstoffhaltigen Bestandteile und die anschließende Bestimmung des freigesetzten Kohlendioxids. Während beim naßchemischen Verfahren die Probe mit Oxidationsmittelgemischen aufgeschlossen wird, erfolgt die Oxidation im thermischen Verfahren bei etwa 1000°C in Gegenwart von Katalysatoren. Das freigesetzte CO₂ läßt sich mit Hilfe der Infrarotspektroskopie sehr genau quantifizieren. Ein zweites Nachweisverfahren beruht auf der Reduktion des Kohlendioxids zu Methan und der anschließenden Bestimmung mittels FID. Der Küvetten-Test der Firma Dr. Lange bedient sich einer photometrischen Methode. Das Einleiten von freigesetztem CO₂ führt zur Farbänderung eines Indikators [Dr. Lange Küvetten-Test, 1997].

Die Bestimmung des TOC-Gehaltes erfolgt über die Differenzmethode. Dabei wird der TOC-Gehalt als Differenz von Gesamtkohlenstoff (TC) und anorganisch gebundenem Kohlenstoff (TiC) errechnet.

3.3 Chromatographische Trennverfahren

Chromatographische Verfahren sind wegen ihrer Fähigkeit, auch sehr komplexe Gemische aufzutrennen, in der analytischen Chemie sehr weit verbreitet. Sie beruhen auf der unterschiedlichen Wechselwirkung der Analyten mit einer stationären und einer mobilen Phase. Der Trenneffekt beruht darauf, daß sich die Verbindungen mit unterschiedlichen, substanzspezifischen Verzögerungen über die chromatographische Trennstrecke bewegen.

3.3.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

In der HPTLC werden Substanzgemische durch die unterschiedliche Verteilung zwischen einer flüssigen mobilen Phase, dem Laufmittel, und einer festen stationären Phase getrennt. Im Gegensatz zur Säulenchromatographie verläuft der Trennprozeß in einem offenen System.

Im allgemeinen gilt die HPTLC als trennschwach, einige Weiterentwicklungen haben ihr allerdings in der letzten Zeit zu neuem Ansehen verholfen. Mit der Bereitstellung von Sorbentien gleichbleibender Qualität ist eine wesentliche Voraussetzung für den Einsatz in der Umwelt- und Pharmaanalytik geschaffen. Als Trennphasen lassen sich sowohl Normalphasen (NP) als auch Umkehrphasen (RP) einsetzen. Die Verringerung der Korngrößen auf unter 10 µm führte zu einer weiteren Verbesserung der Trennleistung. In Verbindung mit dem Einsatz selektiver Detektionsmethoden zur Sichtbarmachung der getrennten Analyten steht dem analytischen Chemiker eine Technik zur Verfügung, die an Schnelligkeit und Einfachheit kaum zu übertreffen ist. Obwohl die zunehmende Instrumentalisierung und Automatisierung quantitative Bestimmungen möglich machen, finden sich die meisten Anwendungen im Bereich der Screeninganalyse und bei der Kontrolle von Reaktionsabläufen in der technischen Chemie [Böcker, 1997].

3.3.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die HPLC ist eine trennanalytische Methode für in Flüssigkeiten lösliche Stoffgemische. Die mobile Phase, in der die Analyten gelöst sind, wird mit hohem Druck durch die mit der stationären Phase gefüllte Trennsäule gedrückt. Dabei werden hohe Anforderungen an die Pumpensysteme hinsichtlich einer pulsationsfreien Lösungsmittelförderung gestellt, um zuverlässige, reproduzierbare qualitative und quantitative Ergebnisse zu erhalten.

In der modernen HPLC verwendet man Packungsmaterialien mit einem Partikeldurchmesser von 3-10 µm. Mitverantwortlich für das enorme Wachstum in der Anwendung der HPLC war die Einführung von Umkehrphasen. Die chemische Modifizierung der Kieselgeloberfläche mit hydrophoben funktionellen Gruppen erlaubt die direkte Analyse wäßriger Proben. Über eine Gradientenelution lassen sich mittels RP-HPLC sowohl polare als auch apolare Komponenten trennen. Der zugrunde liegende Trennmechanismus beruht auf der Anziehung zwischen den Kohlenwasserstoffen der Analyten und den chemisch gebundenen Alkylgruppen des Trägermaterials durch Van-der-Waals-Kräfte.

Die Vielfalt an angebotenen Packungsmaterialien erlaubt eine optimale Anpassung an das jeweilige Trennproblem. Neben Normalphasen wie Kieselgel, Diol- oder Aminophasen und verschiedenen RP-Phasen wie C1, C2, C8 oder C18 werden in zunehmendem Maße stationäre Phasen eingesetzt, die völlig andere Trennselektivitäten besitzen. Als Beispiel seien die graphitierten Phasen erwähnt, die sich besonders zur Trennung von isomeren Stoffgemischen eignen [Koizumi, 1996; Elfakir und Lafosse, 1997]. Zur Analyse von Molekülen im Oligomer- und Polymerbereich wird häufig die Größenausschlußchromatographie (SEC) eingesetzt [Lotz, 1999; Pasch und Kilz, 1999]. Die Verbindungen werden nach ihrem hydrodynamischen Volumen getrennt, d.h. nach der effektiven Molekülgröße der in Lösung befindlichen Makromoleküle. Für eine optimale Trennung stehen Säulenfüllungen mit verschiedenen Ausschlußgrenzen zur Verfügung. Ursprünglich für die Polymerchemie entwickelt, finden sich heute in zunehmendem Maße auch Anwendungen in der Lebensmittelanalytik [Müller und Jork, 1993] und Umweltanalytik [Beste und Hühnerfuss, 1997].

Die HPLC wird zur Methode der Wahl, wenn die Analyten thermolabil sind oder sich keine flüchtigen Derivate erzeugen lassen. Im Bereich der Umweltanalytik steht die Untersuchung von Trinkwasser auf ionogene, anorganische Stoffe im Vordergrund. Eine dominante Rolle spielt die HPLC in der Arzneimittelforschung. In Kopplung mit der Massenspektrometrie (MS) lassen sich die Synthesen von Wirkstoffen überwachen und gleichzeitig optimieren. In der biomedizinischen Analytik steht das Monitoring biologischer Flüssigkeiten wie Urin und Blut im Mittelpunkt. Dabei werden hohe Anforderungen an die Probenvorbereitung gestellt, um eine übermäßige Belastung des HPLC-MS-Systems durch die komplexe Matrix zu vermeiden. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet stellt die präparative HPLC dar. Versagen klassische Verfahren wie Destillation oder Kristallisation, kann die präparative HPLC eingesetzt werden, um Reinstchemikalien aus Syntheserohgemischen oder neue biologisch wirksame Verbindungen aus Naturstoffgemischen zu isolieren [Böcker, 1997].

3.3.3 Gaschromatographie (GC)

Die GC ist aufgrund ihrer hohen Leistungsfähigkeit neben der HPLC die weitverbreitetste analytische Methode zur Bestimmung komplexer Stoffgemische. Sie ist nur für Substanzen geeignet, die sich im Temperaturbereich von 50-400°C verdampfen lassen, ohne sich dabei undefiniert zu zersetzen. Die Entwicklung der „fused silica“-Kapillarsäulen verhalf der GC Ende der 70er Jahre zum endgültigen Durchbruch in der analytischen Chemie.

In der Kapillar-GC befindet sich die stationäre Phase als dünner Film an der Innenseite der Kapillarsäule. Die Säule wird von der mobilen Phase, meist Helium, durchströmt. Als Trennphasen haben sich Polysiloxane bewährt. Sie sind besonders thermostabil und weisen gute chromatographische Eigenschaften auf. In der Rückstandsanalytik findet man besonders häufig Polysiloxane mit einem Methylgruppenanteil von 95 %. Zur Bestimmung hochsiedender Stoffe wurden in den letzten Jahren besonders temperaturstabile Kapillarsäulen, sogenannte Hochtemperatur-GC-Säulen entwickelt. Der Unterschied zwischen konventioneller GC mit einem Arbeitsbereich von unter 330°C und der Hochtemperatur-GC (HT-GC), deren Arbeitsbereich bis auf obere Temperaturgrenzen von 450°C für einige stationäre Phasen erweitert ist, resultiert in einer Ausweitung des Anwendungsbereiches auf Molekulargewichte der zu trennenden Substanzen auf bis zu 1000 g/mol. Das ist für die Praxis ein wichtiger Zugewinn, wie die Analytik von Fettalkohol-ethoxylaten mittels HT-GC mit Atomemissionsdetektion [Asmussen und Stan, 1998a] zeigt. Innerhalb von 70 min lassen sich fast 50 Einzelkomponenten bis zu einem Ethoxylierungsgrad von 17 gaschromatographisch nach ihrem Alkylrest und der Zahl der gebundenen Ethoxyeinheiten auftrennen.

Die Trennung der Analyten in der GC beruht auf einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit durch die Kapillarsäule infolge unterschiedlicher Verteilungskoeffizienten der Substanzen zwischen stationärer Phase und Trägergas. Über die Temperaturabhängigkeit des Verteilungskoeffizienten kann mittels Programmierung der Ofentemperatur direkter Einfluß auf das Trennverhalten ausgeübt werden. Mit der Wahl einer geeigneten Trennphase und entsprechender Säulenparameter wie Filmdicke, Innendurchmesser oder Säulenlänge stehen weitere Variationsmöglichkeiten zur Anpassung des GC-Systems an das jeweilige Trennproblem zur Verfügung. Wichtigstes Charakteristikum einer gaschromatographisch analysierten Substanz ist ihre Retentionszeit

Die gaschromatographische Analyse von thermolabilen, zersetzlichen Proben ist möglich, wenn der Zerfall reproduzierbar verläuft oder wenn stabile, flüchtige Derivate erzeugt werden können. Einige Derivatisierungen bieten zudem die Möglichkeit der Steigerung von Selektivität und Empfindlichkeit der Detektion. Als Derivatisierungsreagenzien werden Substanzen eingesetzt, die sich definiert mit den Analyten umsetzen und nach der Derivatisierungsreaktion problemlos abtrennen lassen. Zu den wichtigsten Derivatisierungen zählen die Silylierung, die Acylierung und die Alkylierung [Syhre et al. 1996]. Unter der Alkylierung versteht man den Austausch aktiver Wasserstoff-Atome durch Alkyl- oder

Arylreste. In der Spurenanalytik haben sich insbesondere Reagenzien wie Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) oder Pentafluorbenzylbromid (PFBB_r) bewährt. Ein häufig eingesetztes Silylierungsreagenz ist das N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA). Die Acylierung bezeichnet den Austausch eines Wasserstoff-Atoms durch einen Säurerest. In der Spurenanalytik sind fluoridierte Säureanhydride wie Trifluoressigsäureanhydrid (TFA) oder Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) weit verbreitet, da sie zu einer deutlichen Steigerung der Empfindlichkeit im Elektroneneinfangdetektor (ECD) führen und im MS typische Fragmente liefern, die eine Identifizierung erleichtern.

Die weite Verbreitung von GC-Systemen beruht auf der empfindlichen und selektiven Detektion der getrennten Analyten mit Detektoren wie den ECD oder den Atomemissionsdetektor (AED). Die Kopplung der hochauflösenden Kapillar-GC mit der massenspektrometrischen Detektion in Verbindung mit unterschiedlichen Ionisierungstechniken stellt hinsichtlich Empfindlichkeit und qualitativer Auswertbarkeit das derzeit leistungsfähigste System in der analytischen Chemie zur Bestimmung flüchtiger, thermisch stabiler Analyten dar.

3.4 Detektorsysteme

3.4.1 Detektion in der HPTLC

Nach der Entwicklung der HPTLC-Platten werden die Substanzen als Flecken oder Banden durch das Abtrocknen des Laufmittels auf der Oberfläche der Trennphase "eingefroren". Verbindungen, die keine Eigenfarbe, UV-Absorption oder Fluoreszenz besitzen, lassen sich durch eine postchromatographische Derivatisierung visualisieren. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt über den Vergleich der Laufstrecken von Analyt und Referenzsubstanz. Eine einfache, halbquantitative Bestimmungsmethode stellt der visuelle Vergleich der Peakintensitäten mit gleichzeitig dünn-schichtchromatographisch entwickelten Referenzsubstanzen bekannter Stoffmenge dar.

Zur quantitativen Auswertung werden die Laufstrecken mit Densitometern abgescannt. In der Regel wird die diffuse Reflexion, auch Remission genannt, gemessen. Der von der Sorptionsschicht remittierte Lichtstrahl wird durch absorbierende Substanzen in seiner Intensität geschwächt. Das Vermessen der Probenbahnen mit Licht einer definierten Wellenlänge, als Lichtquellen werden Deuterium-, Wolfram- oder Quecksilberlampen

verwendet, führt zur Aufzeichnung von Remissions-Orts-Kurven, den HPTLC-Chromatogrammen.

Die Verwendung von selektiven Sprüh- oder Tauchreagenzien bei der Detektion reduziert in vielen Fällen Matrixeffekte. Auch können gewisse Charakteristika der Analyten aus der Lage und Intensität der Absorptionsbanden abgeleitet werden, ein sicherer Nachweis von Substanzen ist in der HPTLC jedoch nur möglich, wenn weitere spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

3.4.2 Universelle Detektoren für HPLC und GC

3.4.2.1 Differentialrefraktometer (RI) und Lichtstreuendetektor (ELSD)

Die meisten der heute eingesetzten nichtionischen Tenside gehören zu Verbindungsklassen, die mit den sonst sehr empfindlichen UV- oder Fluoreszenzdetektoren ohne Derivatisierung nicht erfasst werden können. Als Alternative stehen mit dem RI-Detektor und dem ELSD zwei universelle, aber unempfindliche Detektorsysteme zur Verfügung, um die flüssig-chromatographische Trennung von Stoffgemischen dieser Art zu registrieren.

Das Differentialrefraktometer detektiert alle Substanzen, die eine Veränderung des Brechungsindex im Eluenten hervorrufen. Einige Nachteile schränken die Anwendung jedoch erheblich ein. Neben seiner geringen Empfindlichkeit schließt die Detektion mit einem RI-Detektor die Verwendung von Laufmittelgradienten aus. Zudem führen schon geringe Temperatur- und Druckschwankungen im HPLC-System zur Instabilität des Detektors.

Der ELSD erfaßt über die Streulichtmessung die Konzentration von Partikeln. Dazu wird mit Hilfe von Stickstoff oder Helium das Eluat der HPLC-Trennung in ein Aerosol umgewandelt. Enthält das Eluat unverdampfbare Analyten, so bleiben Probenpartikel zurück, die eingestrahltes Licht streuen. Mit dem ELSD, dessen Empfindlichkeit im Wesentlichen von der Größe der Partikel abhängt, steht dem Analytiker ein gradientenfähiger Detektor zur HPLC-Bestimmung von UV-inaktiven, nichtflüchtigen Substanzen wie Kohlenhydraten, Lipiden, oder Alkylpolyglucosiden zur Verfügung.

3.4.2.2 Flammenionisationsdetektor (FID)

Der FID basiert auf der Verbrennung der nachzuweisenden Substanzen in einer Knallgasflamme. Dabei werden aus kohlenstoffhaltigen organischen Molekülen elektrisch geladene Teilchen gebildet, die an einer Kathode registriert werden. Da mit Ausnahme einiger

weniger Verbindungen fast alle gaschromatographierbaren Substanzen detektiert werden, gilt der FID als universell einsetzbar. Der robuste Detektor, dessen Empfindlichkeit bis in den Nanogramm-Bereich reicht, findet seine Anwendung in allen Bereichen der chemischen Analytik. Seine Grenzen zeigen sich in der Spurenanalytik in Gegenwart komplexer Matrix.

3.4.3 Massenspektrometrie (MS)

Die MS gilt heute neben der Kernresonanzspektroskopie (NMR) und der Röntgenstrukturanalyse als wichtigstes Verfahren zur Strukturaufklärung in der analytischen Chemie. Massenspektren entstehen durch die Ionisierung von Molekülen mit anschließender Trennung der Ionen entsprechend ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z). Nachfolgend werden die in der Arbeit eingesetzten MS-Techniken näher beschrieben.

3.4.3.1 Massenspektrometrie nach Elektronenstoßionisation (EI-MS)

Die Elektronenstoßionisation ist in der GC-MS-Kopplung die derzeit gebräuchlichste Ionisierungsart. Dabei gelingt es, nahezu jede gaschromatographisch getrennte Verbindung zu detektieren, während gleichzeitig über charakteristische Fragmente in den EI-Spektren die schnelle Identifizierung der Analyten erreicht werden kann.

Die Ionen werden in der Ionenquelle aus den gasförmigen Probenmolekülen mit einem hochenergetischen Elektronenstrahl (70 eV) erzeugt. Die Elektronen, die aus einer Glühkathode emittiert werden, treten in Wechselwirkung mit der Elektronenhülle der zu detektierenden Moleküle. Der Energieüberschuß des Elektronenstrahls ist so groß, daß durch Herausschlagen eines Elektrons zumeist einfach positiv geladene Moleküle oder Fragmente gebildet werden, welche nach Beschleunigung und Fokussierung in den Massenanalysator gelangen. In veränderbaren Magnetfeldern (Sektorfeldgeräte) oder elektrischen Hochfrequenzfeldern (Quadrupol- und Ion-Trap-Geräte) werden die erzeugten Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt. Durch Veränderung der Feldstärken kann der Massenanalysator als Massenfilter eingesetzt werden. Im sogenannten Full-Scan-Modus wird der Kollektorspalt zum Analysator so eingestellt, daß ein bestimmter Massenbereich vermessen werden kann. Je größer der zu scannende Massenbereich ist, desto länger dauert ein Meßzyklus (Scan). Zur Steigerung der Sensitivität wird der SIM-Modus (Selected Ion Monitoring) eingesetzt, bei dem die zur Verfügung stehende Meßzeit von ~ 1 s pro Zyklus auf wenige ausgewählte Massen aufgeteilt wird. Detektiert werden die Ionen mit einem Sekundärelektronenvervielfacher (SEV). Dessen photonenempfindliche Schicht emittiert

beim Aufschlagen von Ionen Elektronen, die Stärke des Elektronenstroms ist der Konzentration der detektierten Ionen proportional.

Moderne Auswertesysteme erzeugen aus der Vielzahl an aufgenommenen Massenspektren ein klassisches Chromatogramm. Die Aufsummierung der Intensitäten aller Ionen führt zu den Totalionenchromatogrammen (TIC). Die Extraktion des zeitlichen Verlaufs einzelner Ionen aus dem TIC wird als RIC (Reconstructed Ion Chromatogram) bezeichnet. Für die Identifizierung von Massenspektren unbekannter Substanzen lassen sich empirische Regeln zur Interpretation heranziehen [McLafferty und Turecek, 1995]. Charakteristische Fragmente, die Abspaltung von bestimmten Neutralteilchen oder die Isotopenverteilung erlauben Aussagen über die chemische Struktur unbekannter Verbindungen. Zudem sind die Massenspektren von mehreren tausend Verbindungen in Spektrenbibliotheken (Wiley, HPPest) zum Vergleich gespeichert.

Neben der "harten" EI, in deren Folge fragmentreiche Massenspektren entstehen, liefert die chemische Ionisierung (CI) fragmentarme Spektren. Das Molekülion bzw. das Quasimolekülion und damit die Molmasse der Verbindung ist zumeist direkt ersichtlich. Die Ionisierung erfolgt durch Ionen-Molekül-Reaktionen mit dem im Überschuß vorliegenden Reaktandgas, z.B. Methan oder Ammoniak. Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Elektronenstoßionisation eingesetzt wurde, wird auf eine ausführliche Beschreibung der CI an dieser Stelle verzichtet.

3.4.3.2 Atmosphärendruck-Ionisations-Massenspektrometrie (API-MS)

Die HPLC-MS-Kopplung wird seit Anfang der 90er Jahre in die analytischen Labore eingeführt. Die Unverträglichkeit der großen Lösungsmittelmengen aus der HPLC mit dem Hochvakuumbereich des Massenspektrometers und die schonende Überführung der oftmals nichtflüchtigen, polaren Analyten in die Gasphase stellen die Hauptprobleme der HPLC-MS-Kopplung dar.

Die Vielzahl von Lösungsvorschlägen der letzten Jahre haben zur Entwicklung leistungsfähiger API-Quellen geführt. Die API spielt heute die herausragende Rolle bei den HPLC-MS-Kopplungstechniken. API-Quellen sind besonders geeignet für thermolabile und höher molekulare Verbindungen. Sie sind anwendungsfreundlich und decken mit den Varianten CI (Chemische Ionisierung) und ESI (Elektrospray) praktisch alle Anwendungsgebiete der HPLC-MS-Kopplung ab.

Die chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck steht erst seit etwa 10 Jahren kommerziell zur Verfügung. Das Eluat der HPLC wird bei dieser Technik in einem beheizten Verdampferrohr zerstäubt und fast komplett verdampft. Koaxial zugeführtes Make up-Gas unterstützt diesen Prozeß. In der API-Quelle werden in einem ersten Schritt primäre Reaktand-Ionen gebildet, die aus den Lösungsmittelmolekülen hervorgehen. Die Ionisierung erfolgt an der Corona-Entladungsnadel, an der positive oder negative Spannungen von einigen tausend Volt anliegen. In der Gasphase reagieren die Reaktand-Ionen unter Protonenübertragung oder Deprotonierung mit den Analytmolekülen. Über verschiedene Linsensysteme gelangen die ionisierten Probenmoleküle aus dem Normaldruckbereich ins Hochvakuum.

Die Elektrospray-Ionisierung beruht auf der Einwirkung eines hohen elektrischen Potentials auf das HPLC-Eluat, infolgedessen Ionen mit entgegengesetzter Ladung neutralisiert werden. Daraufhin kommt es zu einer Anhäufung von Ionen gleicher Ladung. Die Selbstabstoßung der elektrostatisch geladenen Oberfläche führt zur Bildung kleiner Tröpfchen, deren Größe durch die Zuführung geheizter Trocknungsgase ständig kleiner wird. Die Coulomb-Explosion führt schließlich zum Eintritt der Ionen in die Gasphase. Die Elektrospray-Ionisierung zählt zu den schonendsten Ionisierungsformen. Sie ist besonders für thermolabile Substanzen geeignet, die schon als Ionen in Lösung vorliegen. Nichtionische Komponenten lassen sich durch den Zusatz von Elektrolyten wie Säuren oder Basen zum Eluenten ionisieren, wenn die Substanzen über entsprechende funktionelle Gruppen verfügen. Sehr häufig beobachtet man im Elektrospray-Modus die Bildung von Adduktionen. Es handelt sich im positiven Modus um Anlagerungsprodukte von Na^+ , K^+ oder NH_4^+ , während sich im negativen Modus bevorzugt HCOOH , CH_3OH oder NaCl -Cluster anlagern.

Im Gegensatz zur Elektronenstoßionisation in der GC-MS-Kopplung, bei der ausreichend Fragmente zur Identifizierung unbekannter Verbindungen gebildet werden, liefern typische API-Spektren oftmals nur Informationen zum Molekulgewicht in Form der Quasimolekülionen. Tochterionen lassen sich in Triple Stage-Quadrupol-Geräten durch die Kollision der Parent-Ionen mit Inertgasen wie Argon oder Stickstoff erzeugen. Die im ersten Quadrupol herausgefilterten Ionen stoßen in der Kollisionszelle mit den Gasteilchen zusammen, die dabei übertragene Energie führt zur Fragmentbildung (Collision Induced Decay, CID). Nach der Fokussierung wird das Fragmentionengemisch im zweiten Massenanalysator aufgetrennt.

Einfache MS-Geräte bedienen sich der in-source CID. Eine erhöhte Potentialdifferenz im Übergangsbereich von Normaldruck zu Hochvakuum bewirkt eine erhöhte kinetische Energie der Ionen. Beim Zusammenprall mit noch vorhandenen Restgasen bilden sich Fragmente, die zur Identifizierung herangezogen werden können. Allerdings setzt die in-source CID eine sehr gute chromatographische Trennung der Analyten voraus, da es andernfalls zur Überlagerung der Tandem-MS (MS/MS)-Spektren co-eluierender Substanzen kommen kann.

3.4.3.3 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) stellt ein wichtiges Instrument in der Analytik hochmolekularer Biomoleküle dar [Hillenkamp et al., 1991]. Prinzipiell sind alle Polymerstoffe analysierbar. Gute Geräte erreichen heute Massengrenzen oberhalb von 40 000 Da [Rehm, 1997].

Die Analyten werden mit einem großen Überschuß an Matrix gemischt. Die Matrix, häufig sind es Derivate der Zimtsäure, bildet nach dem Verdampfen des Lösungsmittels Kristalle, in denen die Probe eingeschlossen ist. Durch die Absorption der eingestrahnten Photonen des Lasers werden die UV-absorbierenden Matrixmoleküle freigesetzt. Gleichzeitig werden die eingebauten Analyten ins Vakuum geschleudert. Die Übertragung von Protonen der sauren Matrixmoleküle auf die Analyten führt zur Bildung positiv geladener Ionen.

Das Gas der positiv geladenen Teilchen wird in einem elektrischen Feld beschleunigt und gelangt anschließend in eine feldfreie Flugröhre. Hier erfolgt die Trennung der einzelnen Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis. Schwere Teilchen erreichen den Detektor zu einer entsprechend späteren Zeit. Typische Flugzeiten liegen im Mikrosekundenbereich.

3.4.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Obwohl die HPLC zur Auftrennung von nichtflüchtigen Verbindungen sehr geeignet ist, erhält man nur selten Aussagen zur chemischen Struktur. Selbst bei Verwendung eines Photodiodenarraydetektors (DAD), der komplette UV-VIS-Spektren getrennter Verbindungen aufnimmt, sind nur sehr beschränkte Strukturaussagen möglich. Mehr Informationen über die chemische Struktur sind verfügbar, wenn die HPLC mit der MS gekoppelt wird. Die Strukturaufklärung von völlig unbekannten Verbindungen oder isomeren Strukturen mittels HPLC-MS, oder auch HPLC-MS/MS ist dagegen nach wie vor nur unzureichend möglich [Reemtsma und Knepper, 1999].

Die NMR gilt als eine der leistungsfähigsten Methoden auf dem Gebiet der Aufklärung der chemischen Struktur organischer Moleküle. Mit der Entwicklung von Hochfeld-NMR-Instrumenten wurde die Empfindlichkeit der NMR-Detektion deutlich verbessert. Die Leistungsfähigkeit der NMR-Spektroskopie bei der Analyse komplex zusammengesetzter Tensidgemische wird in einer Veröffentlichung von Carminati et al. [1988] deutlich.

Der Informationsgewinn läßt sich weiter steigern, wenn die NMR „on-line“ mit chromatographischen Methoden wie HPLC oder SFC (Supercritical Fluid Chromatography) gekoppelt wird. Schlotterbeck et al. [1997] untersuchten Gemische nichtionischer Tenside mittels HPLC-NMR-Kopplung. Nach der Trennung des Fettalkoholethoxylatgemisches mit einer RP-C18-Trennsäule lieferte die ^1H -NMR-Detektion in einem HPLC-Lauf gleichzeitig Informationen über den Verzweigungsgrad des Alkylrestes und den Ethoxylierungsgrad der einzelnen Verbindungen.

Der niedrige natürliche Gehalt an ^{13}C von 1,1 % und das kleine magnetische Moment bedingen eine geringe Empfindlichkeit des ^{13}C -Kerns in der NMR-Spektroskopie, weshalb die online-HPLC-NMR-Kopplung bis auf absehbare Zeit auf die Detektion mittels ^1H -NMR beschränkt bleibt [Albert, 1999].

Ein Optimum an Strukturinformationen wird erhalten, wenn HPLC-MS und HPLC-NMR parallel eingesetzt werden. Während die Massenspektrometrie die Bestimmung des Molekulargewichtes in den Mittelpunkt stellt, führen ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sowie deren Kombination zur Charakterisierung der chemischen Struktur.

Ein Vorteil der NMR gegenüber massenspektrometrischen Methoden ist ihr zerstörungsfreies Arbeiten. Damit ist eine weitergehende off-line-Untersuchung der Probe mit anderen Verfahren problemlos möglich.

Die chemische Verschiebung δ , Kopplungskonstanten und Peakmultiplizitäten bilden die Grundlagen der Strukturaufklärung. Die Fläche unter der Absorptionskurve eines NMR-Signals ist ein Maß für die Intensität eines Überganges. Tetramethylsilan wird als Referenzsubstanz zur Fixierung des Nullpunktes der Skala der chemischen Verschiebung sowohl in der ^1H - als auch bei der ^{13}C -NMR eingesetzt.

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchte Proben

4.1.1 Technische APG-Gemische

Die Untersuchung technischer APG-Gemische war eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit. Es standen vier Produkte der Henkel KGaA und ein Gemisch der Hüls AG zur Verfügung. Wichtige technische Daten der analysierten APG-Gemische sind in Tabelle 4-1 zusammengestellt. Die Produkte werden als trübe, viskose Lösungen mit einem durchschnittlichen Wassergehalt von 52 % vertrieben. Die Lagerfähigkeit wird mit mindestens einem Jahr angegeben.

Tabelle 4-1: Technische Daten untersuchter APG-Gemische

	Plantacare 818 UP	Plantacare 1200 UP	Glucosid 24
Hersteller	Henkel KGaA	Henkel KGaA	Hüls AG
INCI-Name ^a	Coco Glucoside	Lauryl Glucoside	Lauryl Glucoside
Aktivsubstanz	51-55 %	50-53 %	50-54 %
pH-Wert ^b	11,5-12,5	11,5-12,5	9-12 ^c
Zustandsform (20°C)	flüssig	pastös	pastös
Viskosität (20°C)	max 10000 mPas	2000-4000 mPas	2500-4500 mPas
Empfohlene Lagertemperatur ^d	> 15°C	38-45°C	40-50°C

Die technische Daten stammen aus den Datenblättern der Hersteller Henkel KGaA und Hüls AG. Plantacare ist ein eingetragenes Warenzeichen der Henkel KGaA.

^a INCI-Name - International Nomenclature of Cosmetic Ingredients.

^b pH-Wert - ermittelt als 20%ige Lösung in 15%igem Isopropanol.

^c pH-Wert - ermittelt als 1%ige Lösung in vollentsalztem Wasser.

^d Lagerung unterhalb der angegebenen Temperatur führt zu Kristallisationen. Das Gemisch lässt sich durch Erwärmung und Rühren wieder vollständig homogenisieren.

Die unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der APG-Gemische resultieren vorrangig aus ihren unterschiedlichen Zusammensetzungen hinsichtlich des Alkylkettenspektrums. Während Glucopon 225, ein bräunlich gefärbtes Produkt von Henkel ausschließlich kurzkettige Alkylreste beinhaltet, finden sich in den Produkten Plantacare 818 UP und Plantacare 2000 UP Alkylketten, deren Länge von C8 bis C14 reicht. Glucosid 24 und Plantacare 1200 UP enthalten im Unterschied dazu nach Herstellerangaben keine kurzkettigen Alkylreste. Bis auf einen sehr kleinen Rest sind lediglich die Alkylreste C12 und C14 vorhanden.

Angaben über den hydrophilen Zuckeranteil bzw. über dessen chemische Zusammensetzung fehlen in den Produktinformationen völlig. Hill et al. [1997] geben den Polymerisationsgrad von einigen industriell gefertigten APG-Gemischen mit Werten zwischen 1,4 und 1,7 an (siehe auch Tabelle 1-1). Weitergehende Informationen zu den in dieser Arbeit untersuchten technischen APG-Gemischen lagen nicht vor.

4.1.2 Analysen zum biologischen Abbau von Restkonzentraten

Nicht immer wird es möglich sein, tensidhaltige Spülwässer oder die durch die Tensidabtrennung aus Spülwasser gewonnenen Tensidkonzentrate zu verwerten, sei es wegen fehlender Reinheit oder wegen zu geringer Konzentration. APG zählen zwar zu den besonders leicht biologisch abbaubaren Tensiden, wenig ist jedoch über das Abbauverhalten von konzentrierten Lösungen wie sie bei der Anreicherung von APG aus den Spülwässern erwartet wurden, bekannt. Im Teilprojekt E3b wurden aus diesem Grund Untersuchungen zum biologischen Abbau von Restkonzentraten nichtionischer Tenside unternommen.

Zur Entwicklung von analytischen Methoden, insbesondere zur Extraktion der Tenside aus ihrer matrixreichen Umgebung, wurden entsprechende Bioreaktorproben durch das Teilprojekt E3b bereitgestellt. Die wäßrigen Proben enthielten Bakterienkulturen, die auf den Abbau nichtionischer Tenside spezialisiert waren. Von besonderem Interesse war die Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der Tenside an der Oberfläche der Biomasse. Dazu wurden Bioreaktorproben mit technischen APG-Gemischen (Plantacare 2000 UP) und Referenzsubstanzen in Konzentrationsbereichen von 10-5000 mg/l dotiert. Nach Abtrennung der Biomasse wurden die Wiederfindungsraten bestimmt.

Nachdem sich herausstellte, daß die Wiederfindung (WF) langkettiger APG im Überstand der Probenansätze sehr gering war, wurden verschiedene Verfahren wie Membranfiltration, Zentrifugation, Festphasenextraktion (SPE) und Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) bei der Extraktion von APG aus Bioreaktorproben getestet.

Zur Unterscheidung von Adsorption und Abbau der Tenside durch die lebende Biomasse wurden parallele Ansätze mit Biomasse durchgeführt, die vor der Tensidzugabe durch Methanol oder 0,1%ige Natriumazidlösung abgetötet worden war.

4.1.3 Schaumfraktionierung und Membranfiltration

Ziel der Schaumfraktionierung (SF) war eine möglichst hohe Abreicherungsrate von APG aus den Spülwässern ihrer Herstellung. Im Teilprojekt E3a wurde eine vierstufige Schaumfraktionsierungsanlage mit Schaumzerstörer aufgebaut, mit der nichtionische Tenside angereichert werden können. Die Anlage lässt sich sowohl im Batchbetrieb als auch kontinuierlich betreiben. Wie Versuche mit Fettalkoholethoxylaten (AEO) gezeigt haben, führt die SF zu einer Verschiebung der Alkylkettenverteilung [Asmussen und Stan, 1998b]. Deshalb war es von besonderem Interesse das Alkylkettenspektrum von Zulauf, Konzentrat und Klarlauf zu analysieren. Je nach Versuchsansatz standen Probenvolumina von 5-100 ml eines synthetischen Abwassers für die Bestimmung der APG zur Verfügung. Der Zusatz von Methanol bis zu einem Gehalt von 50 % sollte den biologischen Abbau der APG während der Lagerung verhindern. Bestimmungen zum Gehalt an organischem Kohlenstoff (TOC) ließen Proben im Konzentrationsbereich von wenigen Milligramm pro Liter bis 100 g/l erwarten.

Im Teilprojekt E4 wurden Untersuchungen zur Abtrennung von APG mit Ultrafiltrationsmembranen durchgeführt. In einer Technikumsanlage wurden verschiedene Membranen getestet. Als Zielkonzentration war eine Anreicherung auf bis zu 100 g/l geplant. Da Veränderungen in der Gemischzusammensetzung und somit Veränderungen in den Gebrauchseigenschaften nicht auszuschließen waren, wurden Proben, die bei diesen Versuchen anfielen, im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

4.1.4 Kosmetika und Waschmittel

Eine Vielzahl von Fertigprodukten, die direkt aus dem Drogerie-Fachhandel kamen, wurden auf APG untersucht. Nach einem Screening wurde der Gehalt an APG mit verschiedenen Methoden bestimmt. Aus der breiten Produktpalette wurden vier Duschbäder, zwei Flüssigwaschmittel und ein Schaumbad ausgewählt, in denen APG zu erwarten waren. Im einzelnen wurden folgende Fertigprodukte charakterisiert:

- a) Duschbad "Fa - Duschgel Aqua"
- b) Duschbad "Nivea - Pflegedusche"
- c) Duschbad "Palmolive - Pflegendes Duschgel mit Mandelöl"
- d) Duschbad "Tamara - Creme-Duschbad men"
- e) Flüssigwaschmittel Persil
- f) Flüssigwaschmittel Perwoll
- g) Schaumbad "Badedas classic"

Allen Proben gemeinsam ist ihre komplexe Zusammensetzung. Beispielhaft gibt Tabelle 4-2 die Inhaltsstoffe des analysierten Fa-Duschbades laut Produktdeklaration wieder. Unter den Hauptbestandteilen findet sich Lauryl Glucoside, die INCI-Bezeichnung (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients) für ein APG-Gemisch mit einem typischen C12/C14-Alkylkettenspektrum. Alle untersuchten Proben enthalten neben APG weitere Tenside wie Fettalkoholethoxylate (Laureth-2, Laureth-4, Laureth-10), Cocoamidopropylbetain und vor allem anionisches Natriumlaurylethersulfat.

Tabelle 4-2: Inhaltsstoffe des Fa-Duschgels "Aqua"

Inhaltsstoff	Wirkung
Aqua	
Sodium Laureth Sulfate	anionisches Tensid
Cocoamidopropyl Betaine	amphoterer Tensid
Parfume	Duftstoff
Sorbitol	Feuchthaltemittel
Lauryl Glucoside	nichtionisches Tensid
Panthenol	Pflege
Glycerin	Feuchthaltemittel
PEG - 7 Glyceryl Cocoate	Rückfettungsmittel
Lactic Acid, Sodium Lactate	pH-Werteinstellung
Maris Sal	
Polyquaternium - 7 Glycol Distearate	Emulgator
Cocoamide Mea	
Laureth - 10	nichtionisches Tensid
Propylene Glycol	Feuchthaltemittel
Sodium Chloride	Verdickungsmittel
Citric Acid	pH-Werteinstellung
Sodium Benzoate	Konservierungsstoff
CI 42090	Farbstoff

Reihenfolge entspricht der Deklaration auf der Rückseite des Produktes.

4.2 Probenvorbereitung

4.2.1 Technische APG-Gemische

Zur Anreicherung von technischen APG-Gemischen aus wässriger Matrix wurde die Festphasenextraktion (SPE) eingesetzt. Der Vergleich von verschiedenen SPE-Materialien, die in Tabelle 4-3 aufgezählt sind, ergab hinsichtlich der Fähigkeit zur Anreicherung der Tenside keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 4-3: Getestete SPE-Materialien

Handelsname	Hersteller	Typ	Anwendungsform
Bakerbond Polar Plus	Mallinckrodt Baker (Griesheim, D)	RP-C18	1 g/6 ml-Kartusche
Europrep 60-30 C18	Knauer (Berlin, D)	RP-C18	1 g/6 ml-Kartusche
SDB1	Mallinckrodt Baker (Griesheim, D)	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer	0,2 g/3 ml-Kartusche
SDB2	Mallinckrodt Baker (Griesheim, D)	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer	0,2 g/3 ml-Kartusche
ENV+	Separtis (Grenzach-Wyhlen, D)	Styrol-Divinylbenzol-Copolymer	0,2 g/6 ml-Kartusche
	ICT (Bad Homburg, D)	Mischung RP-C18/ Styrol-Divinylbenzol-Copolymer	0,3 g + 0,1 g/ 6 ml-Kartusche
ENVI-Carb	Supelco (Deisenhofen, D)	graphitierter Kohlenstoff	0,5 g/6 ml-Kartusche

In allen weiteren Untersuchungen wurde aus praktischen Gründen ENV+ zur Extraktion von APG verwendet. Dazu wurden 200 mg des SPE-Materials in 6 ml-Kartuschen aus Polyethylen (ICT, Bad Homburg, D) eingewogen. Nach dem Konditionieren mit 6 ml Methanol und nachfolgend 6 ml destilliertem Wasser wurden die Proben unter leichtem Vakuum an einer Vakuumstation (Mallinckrodt Baker, Griesheim, D) durch die SPE-Kartusche gezogen, dabei wurden Tropfgeschwindigkeiten von ca. 15 ml/min nicht überschritten. Zur Vermeidung von Adsorptionsverlusten wurden die Kartuschen und 70 ml-Vorratsgefäße (ICT, Bad Homburg, D) mehrfach mit kleinen Volumina destilliertem Wasser ausgespült. Anschließend wurden die SPE-Kartuschen zuerst mit einem leichten Vakuum, später unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Farbaufhellung des SPE-Materials getrocknet. Die Elution der APG erfolgte mit 2,5 ml Methanol.

Zur weiteren Analyse wurde das Eluat vorsichtig getrocknet. Zur Bestimmung mittels HPLC wurden die Proben in 1 ml Laufmittel aufgenommen, während die mit GC zu

untersuchenden Proben entweder mit Tril Sil[®] oder BSTFA silyliert (Kap. 4.6.1.1) oder mit 6 ml 2N HCl hydrolysiert (Kap. 4.6.2) wurden.

4.2.2 Fertigprodukte aus dem Handel

Die Extraktion von APG aus Fertigprodukten basiert auf der SPE an ENV+ (Kap. 4.2.1). Die große Zahl an Inhaltsstoffen machte aber eine weitere Aufarbeitung der Proben für eine Bestimmung mittels GC-FID (Kap. 4.6.2) erforderlich. Der Rückstand der SPE an ENV+ wurde in 5 ml eines Gemisches aus Chloroform und Methanol (14+1, v/v) aufgenommen und in eine mit 1 g Kieselgel (Separtis, Grenzach-Wyhlen, D) gefüllte 6 ml-Kartusche überführt. Das Kieselgel wurde zuvor mit Chloroform/Methanol (14+1, v/v) konditioniert. Nach dem Trocknen des Kieselgels wurden die APG mit 2,5 ml Methanol von der Sorbensoberfläche desorbiert. Zur Abtrennung der APG von ionischen Begleitstoffe folgte im Anschluß eine Extraktion mit den Ionenaustauschermaterialien SAX und SCX (Separtis, Grenzach-Wyhlen, D). Dazu wurden jeweils 500 mg der beiden SPE-Phasen getrennt in 3 ml-Kartuschen aus Polyethylen eingewogen und mit 5 ml n-Hexan, gefolgt von 5 ml Methanol konditioniert. Das Eluat der Kieselgelextraktion wurde direkt in die SAX-Kartuschen überführt, die APG gelangen ohne in Wechselwirkung mit dem starken Anionenaustauscher zu treten in die mit SCX-Material gefüllten Kartuschen. Als nichtionische Tenside zeigen APG auch mit dem auf Benzensulfonsäure basierenden Kationenaustauschermaterial keine Wechselwirkungen.

Der Durchlauf der beiden miteinander verbundenen Ionenaustauschersäulen wurde aufgefangen und vorsichtig getrocknet. Zur Bestimmung mittels GC-FID wurde der Rückstand mit 6 ml 2N HCl hydrolysiert.

4.2.3 Isolierung von Alkyldiglucosiden

Die Abtrennung von Alkyldiglucosiden aus technischen APG-Gemischen erfolgt durch eine stufenweise Elution. Ausgehend von der Extraktion mit ENV+ (Kap. 4.2.1) wurden die Alkylmonoglucoside nach dem Trocknen des Sorbensmaterials mit 15 ml eines Gemisches aus Cyclohexan und Ethylacetat (1+1, v/v) von der Oberfläche des ENV+ desorbiert. Im Anschluß daran wurde das Festphasenmaterial erneut getrocknet. Die auf der Festphase verbliebenen höher glucosidierten APG-Komponenten wurden schließlich mit 2,5 ml Methanol eluiert. Zur Erhöhung der Trenneffizienz wurde die Festphasenextraktion wiederholt, d.h. die Methanolfraktion wurde noch einmal an ENV+ gereinigt. Das Eluat der

zweiten Aufreinigung wurde zur Fraktionierung mittels RP-HPLC bzw. zur Analyse mittels HPLC-¹H-NMR in HPLC-Eluent gelöst.

4.3 Bestimmung der Trockenmasse

Technische APG-Gemische werden von den Herstellern als viskose, wäßrige Lösungen vertrieben. Probenmengen von jeweils etwa 10 g wurden in gläserne Petrischalen genau eingewogen. Nach dem Vorfrieren der Proben bei -30°C wurde das Wasser in der Gefriertrocknungsanlage Beta IL (Christ, Osterode am Harz, D) entfernt. In Abhängigkeit von der Einwaage war der Trocknungsvorgang nach 24-72 h beendet. Nach der Auswaage der verbliebenen Trockenmasse wurde der Aktivsubstanzgehalt über die Relation von Ein- und Auswaage errechnet.

4.4 Bestimmung des TOC-Gehaltes

Die Bestimmung des TOC-Gehaltes wurde mit dem Küvetten-Test LCK N 381 (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf, D) durchgeführt. In einem Dreifachansatz wurden jeweils 5-10 mg der Trockenmasse der APG-Gemische in 10 ml destilliertem, abgekochtem Wasser gelöst. Zur Bestimmung des Gesamtkohlenstoff-Gehaltes (TC) wurden 200 µl der wäßrigen Probe in die mit dem Aufschlußreagenz gefüllte TC-Küvette pipettiert. Nach dem Verschließen und mehrmaligen Umschwenken wurde die TC-Küvette mit einer vorbereiteten Indikatorküvette verbunden. Parallel dazu wurde die TiC-Küvette mit 1 ml der Probe befüllt. Analog zur Aufarbeitung der TC-Bestimmung wurde die TiC-Küvette mit dem Originaldeckel verschlossen und mehrfach geschüttelt. Im Anschluß daran wurde die TiC-Küvette mit der entsprechenden Indikatorküvette verbunden. Beide Küvettenkombinationen wurden gleichzeitig in einem Thermostaten LT 100 (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf, D) 2 h bei 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Indikatorküvetten mit dem Pocket-Photometer LASA[®]2 plus (Dr. Lange GmbH, Düsseldorf, D) bei einer vorprogrammierten Wellenlänge von 440 nm vermessen.

Der TOC-Gehalt errechnet sich als Differenz von Gesamtkohlenstoff-Gehalt und Gehalt an anorganischem Kohlenstoff.

4.5 Screeningmethoden zur schnellen Analyse von APG

4.5.1 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die HPTLC auf Normal- (NP) und Umkehr-Phasen (RP) liefert einen ersten Einblick in die Zusammensetzung unbekannter Proben. Die parallele Entwicklung einer großen Zahl von Referenzsubstanzen dient der Identifizierung detektierter APG-Komponenten.

Die Probenlösungen wurden mit dem Auftragegerät "ATS III" als schmale Banden von 6 mm Breite auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Die Variation von Sprühgeschwindigkeit und die pro Zeiteinheit zu besprühende Strecke ermöglichten eine Anpassung des Auftragevolumens an das Lösungsmittel der Probe. Aufgetragen wurden je nach Analytkonzentration 1-20 µl. Bis zu 18 Proben (inklusive der Referenzsubstanzen) konnten mit einer Entwicklung untersucht werden.

Tabelle 4-4: Analysenparameter der HPTLC-Bestimmung

Normalphasen-HPTLC	
Sorbens	HPTLC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 10x20 cm, 200 µm Schichtdicke (Merck, Darmstadt, D)
Auftragung	ATS III (Camag, Muttens, CH), 25 µl Spritze
Entwicklung	isokratisch, linear aufsteigend, Normalkammer mit Kammersättigung
Laufmittel	THF/CHCl ₃ /C ₄ H ₉ OH/CH ₃ COOH (62+27+8,5+2,5, v/v/v/v) [Klaffke et al., 1998]
Umkehrphasen-HPTLC	
Sorbens	HPTLC-Fertigplatten RP-18, 10x20 cm, 200 µm Schichtdicke (Merck, Darmstadt, D)
Auftragung	ATS III (Camag, Muttens, CH), 25 µl Spritze
Entwicklung	isokratisch, linear aufsteigend, Normalkammer mit Kammersättigung
Laufmittel	a) CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ COOH (90+10+1, v/v/v) b) CH ₃ OH/H ₂ O/CH ₃ COOH (75+10+1, v/v/v)

Nach der Entwicklung bis zu einer Laufstrecke von 80 mm wurden die HPTLC-Platten vollständig getrocknet. Zur Sichtbarmachung der getrennten APG-Komponenten erfolgte im Anschluß eine postchromatographische Derivatisierung durch das Besprühen der Platten mit dem Anilin-Diphenylamin-Phosphorsäure-Sprühreagenz (6 g Diphenylamin, 6 ml Anilin und 30 ml 85%ige Phosphorsäure wurden mit Methanol zu 300 ml ergänzt.). Zur Entwicklung der Spots wurden die HPTLC-Platten etwa 20 min bei 130°C im Trockenschrank erhitzt. APG wurden als blau-schwarze Banden sichtbar. Die Auswertung erfolgte mit dem TLC-Scanner II

inklusive der dazugehörigen Software Cats 3.16 (Camag, Muttenz, CH) durch das Abscannen der Bahnen mit Wolframlicht der Wellenlänge 540 nm.

Die in Tabelle 4-4 aufgeführten Analysenparameter wurden im Verlaufe dieser Arbeit mehrfach variiert. Insbesondere die Entwicklung von RP-C18-HPTLC-Platten mit einem Laufmittelgemisch der Zusammensetzung $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (75+25+1, v/v/v) erwies sich beim Screening von Proben, die bei der Isolierung höher glucosidierter APG aus technischen APG-Gemischen anfielen, als sehr gut geeignet.

4.5.2 Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion (FIA-MS)

Die FIA-MS ermöglicht ein Screening auf APG innerhalb nur weniger Minuten. Ohne Probenvorbereitung lassen sich APG auch in komplexen Proben bis in einen Konzentrationsbereich von $\sim 1 \text{ mg/l}$ nachweisen und quantifizieren. Die Proben wurden mit Hilfe einer einfachen Spritzenpumpe mit einem konstanten Fluß von $0,01 \text{ ml/min}$ über ein T-Stück in den HPLC-Eluenten Acetonitril/Wasser (40+60, v/v) injiziert. Die HPLC-seitige Flußrate betrug $0,2 \text{ ml/min}$. Ohne chromatographische Trennung gelangten die Analyten in die Ionenquelle. Wichtige Betriebsparameter der FIA-MS von APG sind in Tabelle 4-5 zusammengefaßt.

Über einen Zeitraum von 30 s wurden kontinuierliche Massenspektren im MCA-Modus (Multi Channel Aquisition) aufgenommen. Entsprechend des zu untersuchenden Massenbereiches waren Meßzyklen von 1-2 s pro Scan erforderlich. Die resultierenden Massenspektren wurden mit der MassLynxSoftware 3.2 (Micromass, Manchester, UK) verarbeitet.

Tabelle 4-5: FIA-MS-System zur Bestimmung von APG

LC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, D)	
Infusionspumpe:	Spritzenpumpe Modell 11 (Harvard, Hollisten, USA)	
Massenspektrometer:	Quattro-LC Triple-Stage MS (Micromass, Manchester, UK)	
Ionisierung:	APCI (negativer Modus)	
	Corona:	3,3 kV
	Cone:	40 V
	Source Block Temperature:	120°C
	Probe Temperature:	400°C
Hilfsgas (Stickstoff):	Stickstoffgenerator Whatman 75-72 (Whatman, Haverhill, USA)	
	Nebuliser Gas	600 l/h
	Drying Gas	250 l/h
Analysator:	Ion Energy	0,8 V
	Low Mass and High Mass Resolution	13,0

Die quantitative Bestimmung von APG erfolgte über eine externe Kalibrierung. Dazu wurden Standardlösungen von 5-100 mg/l vermessen. Aus den Mittelwerten der Peakflächen von drei Analysen wurden über das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 die entsprechenden Kalibriergeraden erstellt. Meßwertschwankungen wurden durch den Zusatz des ISTD C9G1 weitgehend ausgeglichen. Zur Vermeidung von Kontaminationen der PEEK-Kapillaren und des MS-Systems wurde zwischen den Proben jeweils 30 s mit dem Lösungsmittelgemisch ACN/H₂O bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,05 ml/min gespült.

Die Identifizierung der APG konnte mittels Tandem-MS abgesichert werden. Als Kollisionsgas wurde Argon 5.0 (99,999 % Ar, Messer, Berlin, D) verwendet. Der Druck in der Kollisionszelle wurde auf etwa 0,0013 mbar, die Kollisionsenergie (CE) in Abhängigkeit vom Glucosiderungsgrad auf 17 eV für monoglucosidische, 25 eV für diglucosidische und 40 eV für oligomere APG eingestellt.

4.6 Quantitative Bestimmung von Einzelkomponenten

Die Quantifizierung von Einzelkomponenten war eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit. Drei komplementäre Analysenverfahren wurden entwickelt, die eine quantitative Erfassung von Einzelkomponenten erlauben. Die Gaschromatographie mit massenselektiver Detektion (GC-MS) nach Silylierung ermöglicht neben der Quantifizierung der Alkylmonoglucoside die Identifizierung von monoglucosidischen Stereoisomeren. Werden APG sauer hydrolysiert, so reduzieren sich die Gaschromatogramme auf wenige Peaks. Die vorkommenden Fettalkohole spiegeln das Alkylkettenspektrum des APG-Gemisches wider. Die Quantifizierung mittels HPLC-MS ermöglicht neben der Erfassung von monoglucosidischen Verbindungen auch die quantitative Bestimmung der Alkyldiglucoside. Nachfolgend werden diese Methoden in ihren Details näher beschrieben.

4.6.1 Bestimmung von Alkylmonoglucosiden mittels GC-MS

4.6.1.1 Probenvorbereitung

Extrahiert wurden die Alkylmonoglucoside mittels SPE (Kap. 4.2) oder mittels Gefrier-trocknung (Kap. 4.3). Die Proben wurden in getrocknetem Zustand zur Silylierung eingesetzt. Nach Zugabe von 100 µl Reacta Sil[®] (Aldrich, Steinheim, D) wurde das Probenfläschchen mit einer Aluminium-Bördelkappe verschlossen und 20 s kräftig geschüttelt. Die Silylierung war nach 60 min bei Raumtemperatur beendet. Anschließend wurden die Proben mit 900 µl

Ethylacetat verdünnt, dabei ausfallendes NH_4Cl wurde durch zehnminütiges Zentrifugieren bei 2000 U/min abgetrennt. Ein Aliquot des klaren Überstandes wurde für die GC eingesetzt.

Alternativ dazu wurden APG auch mit BSTFA (Sigma, Deisenhofen, D) silyliert. Die getrocknete Probe wird mit 50 μl Pyridin und 50 μl des Derivatisierungsreagenzes versetzt. Die Umsetzung bei 90°C wurde nach 60 min durch die Verdünnung mit Ethylacetat beendet.

4.6.1.2 Geräteparameter des GC-MS-Systems

Die Trimethylsilyl (TMS)-derivate der Alkylmonoglucoside wurden gaschromatographisch auf einer HP 5 Kapillarsäule (Hewlett Packard, Waldbronn, D) getrennt und mittels MS nach Elektronenstoßionisation detektiert. Die apolare Trennphase mit einem Methylgruppenanteil von 95 % und einem 5%igen Phenylgruppenanteil eignete sich sehr gut zur Chromatographie der mittelpolaren und apolaren Komponenten. Die verwendeten Betriebsparameter sind in Tabelle 4-6 aufgelistet.

Tabelle 4-6: GC-MS-System zur Bestimmung von Alkylmonoglucosiden

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II
Autosampler:	HP 7673 A
Trärgas:	Helium 5.0; 2 ml/min
Injektion:	1 μl splitlos, Splitöffnung nach 60 s
Injektortemperatur:	270°C
Trennsäule:	HP 5; 25 m; i.D. 0,25 mm; Filmdicke 0,17 μm
Vorsäule:	HP 5; 1 m; i.D. 0,25 mm; Filmdicke 0,17 μm
Temperaturprogramm:	70°C - 12 s - 50°C/min - 170°C - 20°C/min - 300°C - 45 min
Massenspektrometer:	HP 5970
Quellentemperatur:	310°C
Ionisierung:	EI (70 eV)
Betriebsart:	Full-Scan-Modus (50-650 amu), Datenaufnahme von 5-20 min
Datenauswertung:	HP Chemstation Software G1701AA Version A.03.00

4.6.1.3 Quantitative GC-MS-Analyse von Alkylmonoglucosiden

Die quantitative Bestimmung von Alkylmonoglucosiden erfolgte über den internen Standard C7G1. In einer Dreifachbestimmung wurden die Responsefaktoren der reinen β -D-Alkylmonoglucopyranoside C8, C10 und C12 ermittelt. Dazu wurden DMF-Lösungen der Vergleichssubstanzen in einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt. 50 μl dieser Lösungen

wurden nach dem Zusatz von 50 µl des ISTD (2 mg/ml in DMF) getrocknet und mit Tril Sil[®] silyliert. Nach der Verdünnung mit Ethylacetat und dem Entfernen des NH₄Cl wurde 1 µl in den GC injiziert.

Ausgewertet wurden die Peakflächen des Ions $m/z = 204$. Dieses Ion bildet den Basepeak aller Trimethylsilylderivate von pyranosiden Alkylmonoglucosiden. Dazu wurde aus den Totalionenchromatogrammen das entsprechende Ionenchromatogramm (RIC) extrahiert. Die Responsefaktoren wurden über folgende Formel bestimmt:

$R_p = \frac{F_{(ISTD)}}{F_{(Analyt)}} \times \frac{m_{(Analyt)}}{m_{(ISTD)}}$	Rp:	Responsefaktor des Analyten zum ISTD
	F _(ISTD) :	Peakfläche des ISTD
	F _(Analyt) :	Peakfläche des Analyten
	m _(ISTD) :	Einwaage des ISTD in der Stammlösung
	m _(Analyt) :	Einwaage des Analyten in der Stammlösung

Die Aufarbeitung der technischen und kosmetischen Proben erfolgte entsprechend Kap. 4.2. Der interne Standard wurde vor der Aufnahme der Probe in DMF zugesetzt. Der Gehalt an APG wurde über die nachstehende Formel errechnet:

$m_{(Analyt)} = \frac{F_{(Analyt)}}{F_{(ISTD)}} \times m_{(ISTD)} \times R_p$	Rp:	Responsefaktor des Analyten zum ISTD
	F _(ISTD) :	Peakfläche des ISTD in der Probe
	F _(Analyt) :	Peakfläche des Analyten in der Probe
	m _(ISTD) :	Einwaage des ISTD in der Probe
	m _(Analyt) :	Einwaage des Analyten in der Probe

Die Bestimmung von C14G1 erfolgte über den angenäherten Responsefaktor der Verbindung C12G1. Anomere wurden über den gleichen Responsefaktor ausgewertet. Furanoside Verbindungen wurden in die Quantifizierung nicht einbezogen. Zur Ermittlung des Korrekturfaktors, der die maximale WF der Analysenmethode berücksichtigt, wurden bekannte Mengen von Referenzmaterial eingewogen, mit dem ISTD versetzt und die WF in der gleichen Weise bestimmt.

4.6.2 Bestimmung von APG mittels GC-FID nach Hydrolyse

4.6.2.1 Probenvorbereitung

Technische APG-Gemische wurden nach Kap. 4.2.1 angereichert. Bedingt wegen ihrer komplexen Zusammensetzung wurden kosmetische Proben entsprechend Kap. 4.2.4 aufgearbeitet. Bioreaktorproben wurden vor der GC-FID-Analyse durch Zentrifugation (5 min, 2000 min⁻¹) von der Biomasse befreit werden, um Kontaminationen und Überbefunde zu vermeiden.

Der getrocknete Rückstand wurde mit 6 ml 2N HCl hydrolysiert. Die mit Butyl-Septen verschlossenen 20 ml Headspace-Probengefäße (Hewlett Packard, Waldbronn, D) wurden 90 min bei 103°C im Trockenschrank erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit 6 ml 2N NaOH neutralisiert. Die hydrolytisch freigesetzten Fettalkohole wurden mit 2,5 ml Ethylacetat, welches den internen Standard n-Nonanol in der Konzentration 10 µg/ml enthielt, ausgeschüttelt. Ein Aliquot der organischen Phase wurde mittels GC-FID analysiert.

4.6.2.2 Geräteparameter des GC-FID-Systems

Die gaschromatographisch getrennten Fettalkohole wurden mittels Flammenionisationsdetektor detektiert. Die Trennung erfolgte auf einer DB-5 HT Kapillarsäule (J&W Scientific, Folsom, USA). Wichtige Betriebsparameter sind in Tabelle 4-7 aufgelistet.

Tabelle 4-7: GC-FID-System zur Bestimmung von Fettalkoholen

Gaschromatograph:	HP 5890 Series II inkl. Autosampler HP 7673 A
Trärgas:	Helium 4.6; 1.7 ml/min
Injektion:	2 µl splitlos, Splitöffnung nach 60 s
Injektortemperatur:	260°C
Insertliner:	glatt, deaktiviert, 2 mm i.D. (Hewlett Packard, Waldbronn, D)
Trennsäule:	DB-5 HT; 15 m; i.D. 0,32 mm; Filmdicke 0,1 µm
Vorsäule:	unbelegtes, deaktiviertes fused silica retention gap (1 m x 0,32 mm)
Temperaturprogramm:	70°C - 1,5 min - 30°C/min - 280°C - 6,5 min
Detektor:	FID, 300°C
Brenngase:	Wasserstoff, 18 ml/min; Luft, 300 ml/min
Make up-Gas:	Stickstoff 4.6, 27 ml/min
Datenaufnahme:	PC über Nelson Interface 2600
Datenauswertung:	TurboChrom Navigator 4.1 (Perkin Elmer, Überlingen, D)

Die routinemäßige Anwendung dieser Methode machte eine ständige Wartung des GC-FID-Systems erforderlich. In Abständen von etwa 6-8 Wochen wurde die Vorsäule und der Insert-Liner ausgetauscht.

4.6.2.3 Quantitative Bestimmung technischer APG-Gemische

Die hydrolytisch freigesetzten Fettalkohole wurde über eine externe Kalibrierung quantifiziert. Ethylacetat-Lösungen der Fettalkohole C8, C10, C12 und C14 mit Konzentrationen von 5-80 mg/l wurden injiziert. Aus den Meßwerten, sechs Konzentrationen wurden je zweimal vermessen, wurden die vier Kalibriergeraden erstellt. Der beim Ausschütteln zugesetzte ISTD diente dem Ausgleich von Schwankungen der LLE. Den Kosmetika und Waschmitteln wurde vor der SPE C11G2 als zweiter ISTD zugesetzt, um die Effizienz der Extraktion (ENV+ → Kieselgel → SAX/SCX) zu kontrollieren.

Der ermittelte Fettalkoholgehalt wurde über das mittlere Molekulgewicht in den Gehalt an APG umgerechnet. Das mittlere Molekulgewicht berechnet sich bei Annahme eines typischen Polymerisationsgrades von 1,5 als Mittelwert der Molekulgewichte der jeweiligen Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside. Der Gesamtgehalt an APG wurde als Summe der Einzelgehalte bestimmt.

4.6.3 Bestimmung von Mono- und Diglucosiden mittels HPLC-MS

4.6.3.1 Probenvorbereitung

APG wurden nach Kap. 4.2 aus den Proben extrahiert. Das Eluat der SPE wurde unter Stickstoff vorsichtig getrocknet. Nach Zugabe von 10 µl C9G1 ($c = 1 \text{ mg/ml}$) wurden die Proben in 990 µl HPLC-Eluent aufgenommen. Zur Vermeidung von Kontaminationen des HPLC-MS-Systems wurden die Proben vor der Injektion membranfiltriert. Verwendet wurden Einmalfilter mit einer Membran aus Polyamid der Porenweite 0,2 µm (Muder & Wochele, Berlin, D). Ein Aliquot (1-20 µl) wurde in die HPLC injiziert.

Proben höherer Konzentrationen ließen sich ohne zusätzliche Anreicherung mittels HPLC-MS-Kopplung analysieren. Dazu wurden 5-15 mg der Trockensubstanz oder 25-50 ml der zumeist flüssigen Kosmetika oder Waschmittel nach Zugabe des ISTD im HPLC-Eluenten gelöst und membranfiltriert.

4.6.3.2 Geräteparameter des HPLC-MS-Systems

Die HPLC-MS-Analyse von APG beruht auf der Trennung der Einzelkomponenten mit einer RP-C8-Trennsäule und der Detektion der Tenside im negativen Modus des APCI. Die Parameter der Ionisierung der Analyten wurden so gewählt, daß eine maximale Ausbeute an Ionen und damit eine maximale Empfindlichkeit erreicht wurde. Die Ionisationsbedingungen entsprechen den Einstellungen, die für die FIA-MS optimiert worden sind.

Wichtige Analysenparameter sind in Tabelle 4-8 aufgelistet. Je nach Aufgabe kamen die angegebenen Eluenten zum Einsatz. Daneben wurde die HPLC bei der fraktionellen Anreicherung von Decyl-Diglucosiden isokratisch (CH₃CN/H₂O, 35+65, v/v) betrieben.

Tabelle 4-8: Flüssigchromatographische Trennung von APG

LC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, D)
Trennsäule:	Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Vorsäule:	Nucleosil 100 RP-C8, 3 x 4,6 mm, 5 µm
Säulen-Temperatur:	25°C
Eluent:	A = Acetonitril, B = Wasser, f = 1,0 ml/min Gradient A: 0-3 min 40 % A, linear in 7 min auf 80 % A, 10-15 min 80 % A Gradient B: 0 min 40 % A, linear in 10 min auf 80 % A, 10-15 min 80 % A Gradient C: 0 min 35 % A, linear in 10 min auf 50 % A, linear in 2 min auf 80 % A, 12-15 min isokratisch
Injektionsvolumen:	variabel (1-20 µl)

Tabelle 4-9: SIR-Detektion von APG

Substanz		Molekülgewicht [g/Mol]	[M-H] ⁻
n-Octyl-D-Monoglucopyranosid	C8G1	292	291
n-Nonyl-D-Monoglucopyranosid (ISTD)	C9G1	306	305
n-Decyl-D-Monoglucopyranosid	C10G1	320	319
n-Dodecyl-D-Monoglucopyranosid	C12G1	348	347
n-Tetradecyl-D-Monoglucopyranosid	C14G1	376	375
n-Octyl-D-Maltopyranosid	C8G2	454	453
n-Decyl-D-Maltopyranosid	C10G2	482	481
n-Dodecyl-D-Maltopyranosid	C12G2	510	509
n-Tetradecyl-D-Maltopyranosid	C14G2	538	537
n-Hexadecyl-D-Maltopyranosid	C16G2	566	565

Die Datenauswertung erfolgte mit der MasslynxSoftware 3.2 (Micromass, Manchester, UK). Je nach Zielstellung wurden im Selected Ion Monitoring (SIR)-Modus bis zu 10 verschiedene Ionen detektiert. Das Masse/Ladungs-Verhältnis entsprach den Quasimolekülen $[M-H]^-$ (Tabelle 4-9). Bei einer Dwell Time von 0,2 s pro Ion dauerte ein Meßzyklus ca. zwei Sekunden. Bei einer Peakbreite von etwa 30 s wurden somit 15 Meßpunkte pro Verbindung aufgenommen.

4.6.3.3 Quantitative HPLC-MS-Analyse

Die Quantifizierung der Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside erfolgte über externe Kalibrierung. Standardlösungen der Referenzsubstanzen (C8-C12G1, C8-C14G2) wurden im Konzentrationsbereich von 0,1-10 mg/l injiziert. Aus den gemittelten Peakflächen der SIR-Chromatogramme wurden die Kalibriergeraden erstellt. In einem Dreifachansatz wurden je Kalibriergerade fünf Eichpunkte ermittelt. Die Bestimmung von C14G1 erfolgte über die Kalibrierung von C12G1. Diglucoside wurden über die Summe aller detektierten Peakflächen in den einzelnen Ionenspuren quantifiziert. Durch den Zusatz von C9G1 als ISTD konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse deutlich verbessert werden.

4.7 Chemische Charakterisierung von Einzelkomponenten

4.7.1 MALDI-TOF-MS zum Nachweis von Alkyloligoglucosiden

Zur Untersuchung von APG mittels MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry) wurden 5 mg Glucopon 225 in DMF gelöst. Als Matrix wurde α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure in 30%igem Acetonitril gelöst und mit Trifluoressigsäure (0,07 %) versetzt. Gleiche Mengenanteile der Probe und der Matrix wurden direkt auf der Platte gemischt. Die Bestimmung erfolgte mit einem MALDI Voyager ELITE Time of Flight Massenspektrometer (Perseptive BioSystems, Framingham, USA). Das Gerät war mit einem Stickstofflaser ausgerüstet, der Licht der Wellenlänge 337 nm emittiert. Mit einer Spannung von 20 kV wurden die gebildeten Ionen beschleunigt. Detektiert wurden die Na^+ -Addukte positiv geladener Ionen. Die Verwendung eines Low Mass Gates bot die Möglichkeit störende Matrixbestandteile ($m/z < 500$) auszublenden. Das MS wurde im Reflektor-Modus betrieben, d.h. die Ionen wurden nach einer linearen Driftstrecke in einem Reflektorfeld abgelenkt, um dann auf einen weiteren Detektor zu treffen.

4.7.2 Trennung von Stereoisomeren an Hypercarb S

Hypercarb S (Hypersil, Runcorn, UK) bezeichnet eine HPLC-Phase, die aus porösem Kohlenstoff aufgebaut ist. Verglichen mit anderen Trennphasen zeichnet sie sich durch die Fähigkeit aus, stereoisomere Verbindungen trennen zu können. APG werden nach Alkylrest, Glucosidierungsgrad und räumlicher Struktur getrennt. Die Anwendung dieses Säulenmaterials in der Routineanalytik wäre jedoch problematisch, da insbesondere langkettige Verbindungen sehr stark retardieren.

Zur Trennung von Glucopon 225, einem APG-Gemisch mit kurzkettigen Komponenten wurde Methanol als Eluent eingesetzt. Mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min gelang die vollständige Auftrennung der monoglucosidischen und diglucosidischen Komponenten des Gemisches innerhalb von 20 min. Die Trennung wurde mit einer Hypercarb S-Trennsäule (100 x 2,1 mm, Partikelgröße 5 µm) durchgeführt. Neben der Detektion im Full-Scan-Modus wurde vorrangig im SIR-Modus gearbeitet. Einerseits wurden die Tenside sehr selektiv erfaßt, andererseits konnte die Datenmenge erheblich reduziert werden. Wichtige Analysenparameter sind in Tabelle 4-10 zusammengestellt.

Ein Ziel der Arbeit mit Tandem-MS war die Aufklärung der chemischen Struktur unbekannter Verbindungen. Deshalb wurden die Tochterionenspektren einzelner APG auf charakteristische Fragmente untersucht. Einzelheiten zur Durchführung der MS/MS-Analysen finden sich in Kapitel 4.7.3. Neben der Aufnahme kompletter Tochterionenspektren wurden auch Analysen im MRM-Modus (Multiple Reaction Monitoring) durchgeführt.

Tabelle 4-10: HPLC zur Analytik stereoisomerer APG

LC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, D)
Trennsäule:	Hypercarb S , 100 x 2,1 mm, 5 µm
Säulen-Temperatur:	25°C
Eluent:	Methanol, 0,4 ml/min
Detektion:	Quattro-LC Triple-Stage MS
Ionisierung:	APCI- (Full-Scan, SIR, Tochterionen-Scan, MRM)
Datenauswertung:	MassLynxSoftware 3.2 (Micromass, Manchester, UK)

4.7.3 Konformations- und Strukturanalyse mittels HPLC-MS/MS

Auf der Grundlage der zuvor entwickelten HPLC-MS-Methode wurde eine HPLC-MS/MS-Methode erarbeitet, mit deren Hilfe die Identität von APG abgesichert und die Struktur unbekannter Komponenten charakterisiert werden sollte.

Zur Fragmentierung wurden die Analyten einer Kollision mit Argon unterworfen. Der Energieeintrag führte zu einem Zerfall der Parent-Ionen. Aus Versuchen mit deuteriertem Referenzmaterial *n*-Octyl- d_{17} - β -D-Glucopyranosid- d_7 und *n*-Octyl- d_{17} - β -D-Glucopyranosid sollten Rückschlüsse über den Mechanismus der Fragmentierung gezogen werden. Untersucht wurden daneben technische APG-Gemische, kosmetische Erzeugnisse und die nach Kap. 4.2.3 aus Glucopon 225 angereicherten Alkyldiglucoside. Die flüssigchromatographisch getrennten Komponenten wurden im negativen Modus des APCI ionisiert. Die Parameter der Ionisierung entsprachen den Bedingungen, wie sie für die FIA-MS/MS optimiert wurden (vgl. Kap. 4.5.2). Es wurden Probenkonzentrationen von etwa 1 mg/ml eingesetzt, um auswertbare Tochterionenspektren zu erhalten. Tabelle 4-11 liefert eine Übersicht der wichtigsten Analysenparameter.

Versuche zur Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS wurden ebenfalls durchgeführt. Dabei wurde jedoch festgestellt, daß die Zunahme der Selektivität eine Verringerung der Sensitivität um den Faktor 100 gegenüber der Bestimmung von APG mittels HPLC-MS im SIR-Modus zur Folge hat. Das Arbeiten mit Zeitfenstern wie es aus der GC-MS für den Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus bekannt ist, erwies sich als nicht praktikabel, da die Alkyldiglucoside technischer APG-Gemische über eine große Zeitspanne von der HPLC-Säule eluieren.

Tabelle 4-11: HPLC-MS/MS-Analyse von APG

LC-System:	HP 1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, D)
Chromatographie:	a) Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m Acetonitril-Wasser-Gradienten A+B; 1,0 ml/min b) Hypercarb S, 100 x 2,1 mm, 5 μ m Methanol; 0,4 ml/min
APCI-Bedingungen:	negativer Modus Corona: 3,3 kV, Cone: 40 V, Probe-Temperatur: 400°C
Kollisionsgas:	Argon 5.0 (0,0013 mbar)
Kollisionsenergie:	17 eV (G1), 25 eV (G2), 40 eV (G3)
Betriebsarten:	Tochterionen-Scan, MRM

4.7.4 Untersuchung von Glucopon 225 mittels HPLC-¹H-NMR

Glucopon 225 wurde an ENV+ aufgereinigt. Die dabei angereicherten oligoglucosidischen Verbindungen wurden nach Aufarbeitung (nähere Erläuterungen Kap. 4.2.3) in 1-2 ml HPLC-Eluent gelöst. Als Lösungsmittel wurden Acetonitril NMR CHROMASOLV (Riedel de Haen, Seelze, D) und D₂O (99,9 % D, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, UK) verwendet. Die HPLC-Bedingungen waren mit Ausnahme der HPLC-Pumpe Varian 9012 (Varian, Palo Alto, USA) mit denen der RP-C8-HPLC-MS-Bestimmung identisch (Kap 4.6.3.2). Zur besseren Trennung der kurzkettigen Alkyldiglucoside wurde der Gradient C eingesetzt (Tabelle 4-8). 100 µl der angereicherten Probe wurden injiziert.

Die Detektion erfolgte mit einem Varian Unity Inova 600 NMR-Spektrometer (Varian, Palo Alto, USA) das bei einer Meßfrequenz von 599,82 MHz betrieben wurde. Für on-line-¹H Experimente war das Gerät mit einem ¹H-60 µl Microflow-Invers-Durchflußprobenkopf ausgestattet. Die intensiven Lösungsmittelsignale von CH₃CN und HOD wurden mit einer Kombination von speziellen Pulssequenzen unterdrückt. Die aufgenommenen Daten wurden als zweidimensionale Matrix behandelt, wobei die ¹H-NMR-Spektren als Funktion der Retentionszeit abgebildet wurden. Zur Auswertung wurde die Varian VNMR-Software eingesetzt. Nach einer vorläufigen Auswertung des on-line-¹H-Plots wurde eine interessante Verbindung A angereichert, die in weiteren statischen NMR-Experimenten untersucht wurde.

4.7.5 Strukturaufklärung mittels ¹H- und ¹³C-NMR

In konventionellen "statischen" NMR-Experimenten wurde sowohl die Referenzverbindung C12-α-G2 als auch die mittels HPLC-Trennung gewonnene Verbindung A untersucht. Nach der HPLC-Fraktionierung wurde die Probe vorsichtig am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt. Anschließend wurde der Rückstand in Methanol aufgenommen, um den Rücktausch von Deuterium gegen Wasserstoff zu erreichen. Nach dem erneuten Trocknen wurde der Rückstand für die NMR-Experimente in 200 µl DMSO-d₆ aufgenommen.

Das Varian Unity Inova 600 NMR-Spektrometer (Varian, Palo Alto, USA) war für die statischen NMR-Experimente mit einem 3 mm Probenkopf ausgestattet. Neben eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren wurden Korrelationsspektren wie COSY (H-H-Korrelation) und HSQC (Hetero Single Quantum Coherence) zur Identifizierung des Zielanalyten A aufgenommen. Anfallende Daten wurden mit der Varian VNMR-Software verarbeitet.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Bestimmung der Trockenmasse technischer APG-Gemische

Die Trockenmasse technischer APG-Gemische, gleichbedeutend mit der Aktivsubstanz, stellt ein Merkmal dieser Gemische dar. In einer Dreifachbestimmung wurde die Trockenmasse technischer APG-Gemische ermittelt und mit den Angaben der Hersteller verglichen (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Bestimmung der Trockenmasse

Gemisch	Trockenmasse [%]	Herstellerangaben [%]
Plantacare 818 UP	$53,7 \pm 0,9$	51-55
Plantacare 1200 UP	$53,8 \pm 1,2$	50-53
Plantacare 2000 UP	$55,7 \pm 0,7$	51-55
Glucopon 225	$73,0 \pm 0,9$	keine Angabe
Glucosid 24	$54,5 \pm 0,4$	50-54

Für die ermittelte Trockenmasse sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten aus drei Analysen angegeben.

Die gefundenen Mittelwerte liegen in allen Fällen an der oberen Grenze der Herstellerangabe. Einschränkend muß erwähnt werden, daß nur jeweils eine Charge der technischen Formulierungen zur Verfügung stand, während die Angaben von Henkel und Hüls Toleranzgrenzen bei der Auslieferung an das verarbeitende Gewerbe darstellen.

Mit einer Trockenmasse von ~ 73 % bildet das Gemisch Glucopon 225 ein Ausnahme unter den analysierten Proben. Alle anderen Gemische besitzen einen Aktivsubstanzgehalt von ~ 55 %.

5.2 TOC-Gehalt

Die Bestimmung des TOC-Gehaltes erlaubt den Rückschluß auf anorganische Begleitstoffe in der Trockenmasse. Aus der Tatsache, daß bei der Bestimmung von APG mittels GC-MS nur ~ 42 % der eingewogenen Trockenmasse wiedergefunden werden konnten, wurde vermutet, daß die Proben weitere Bestandteile wie z.B. Salze enthalten.

Die Firma Dr. Lange GmbH bietet einen Schnelltest zur Bestimmung des Gesamtgehaltes an organischem Kohlenstoff an. Dieser errechnet sich als Differenz des Gesamtkohlenstoffgehaltes und dem Anteil an anorganischem Kohlenstoff. Der Aufschluß erfolgt oxidativ. Das

freigesetzte CO₂ wird photometrisch bestimmt. Der TOC-Gehalt wurde mit dem theoretischen Wert verglichen (Tabelle 5-2).

Grundlage der TOC-Bestimmung ist die Ermittlung eines mittleren Molekulargewichtes. Zur Vereinfachung wurde ein mittlerer Polymerisationsgrad von 1,5 angenommen. Dann errechnet sich das mittlere Molekulargewicht (MW) wie folgt:

$$MW = a_{C8} * M_{C8} + a_{C10} * M_{C10} + a_{C12} * M_{C12} + a_{C14} * M_{C14}$$

$$M_{Cx} = [M_{CxG1} + M_{CxG2}]/2$$

$a_{C8...a_{C14}}$ molekularer Anteil der jeweiligen Alkylkettenlänge (C8-C14)

M_{Cx} Molekulargewicht von Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

M_{CxG1} Molekulargewicht von monoglucosidischen Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

M_{CxG2} Molekulargewicht von diglucosidischen Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

Der Anteil an organisch gebundenem Kohlenstoff errechnet sich nach folgender Formel:

$$MW(C) = a_{C8} * M(C)_{C8} + a_{C10} * M(C)_{C10} + a_{C12} * M(C)_{C12} + a_{C14} * M(C)_{C14}$$

$$M(C)_{Cx} = [M(C)_{CxG1} + M(C)_{CxG2}]/2$$

$a_{C8...a_{C14}}$ molekularer Anteil der jeweiligen Alkylkettenlänge (C8-C14)

$M(C)_{Cx}$ Molekulargewicht des C-Anteils von Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

M_{CxG1} Molekulargewicht von monoglucosidischen Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

M_{CxG2} Molekulargewicht von diglucosidischen Verbindungen der Alkylkettenlänge mit x C-Atomen

Die quantitative Bestimmung zeigt, daß bei allen untersuchten Gemischen mehr als 92 % der Trockensubstanz aus Verbindungen bestehen, die organisch gebundenen Kohlenstoff enthalten. Die Differenz zu 100 % läßt sich als Fehler der Berechnung des theoretisch erwarteten Kohlenstoffgehaltes erklären. Bei Annahme eines höheren Polymerisationsgrades steigt die Wiederfindungsrate (WF). Insgesamt kann mit den gefundenen Ergebnissen aber nicht sicher ausgeschlossen werden, daß die Trockenmasse Begleitstoffe wie Salze oder das zur pH-Wert-Einstellung verwendete Mg₂O enthält.

Tabelle 5-2: TOC-Gehalt der Trockenmasse technischer APG-Gemische (n=3)

Gemisch	MW [g/Mol]	MW(C) [g/Mol]	theoretisch* mg/l C	ermittelt mg/l C	[%]
Plantacare 818 UP	415	240	468	437 ± 4	93,4
Plantacare 1200 UP	436	258	453	417 ± 7	92,0
Plantacare 2000 UP	407	233	434	410 ± 8	94,5
Glucopon 225	387	217	429	398 ± 12	92,8
Glucosid 24	436	258	430	416 ± 7	96,7

* Der theoretische TOC wurde über den Kohlenstoff-Anteil am mittleren Molekulargewicht bestimmt.

5.3 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung ist ein wichtiger Bestandteil der chemischen Analytik. Vorrangige Ziele sind die Anreicherung der nachzuweisenden Analyten und deren gleichzeitige Abtrennung von störender Matrix. Im Verlaufe dieser Arbeit wurden neben der Gefriertrocknung insbesondere Methoden auf Grundlage der Festphasenextraktion (SPE) entwickelt. Vorversuche mit Flüssig/Flüssig-Extraktion (LLE) wurden nicht weiter verfolgt, da durch Emulsionsbildung Probleme bei der Phasentrennung auftraten.

5.3.1 Anwendung und Grenzen der Gefriertrocknung (GF)

Die Gefriertrocknung wurde zu Beginn der vorliegenden Arbeit als Methode der Wahl zur Anreicherung von APG eingesetzt. Bei der Gewinnung von Trockensubstanz erwies sie sich als ein geeignetes Verfahren. Auch Fertigprodukte aus dem Handel, deren APG-Gehalt im Konzentrationsbereich um 1 % liegt, konnten auf diesem Wege getrocknet werden. Mit der Aufnahme des Rückstandes in DMF, einem besonders guten Lösungsmittel für Kohlenhydrate und Kohlenhydratderivate, bestand die Möglichkeit, einen Teil der Matrix abzutrennen, sofern die Löslichkeit der Begleitstoffe in DMF reduziert war. Die GF wurde erfolgreich zur Bestimmung von APG sowohl in technischen als auch kosmetischen Erzeugnissen eingesetzt [Billian und Stan, 1998]. Die Nachweisgrenze der Bestimmung von Alkylmonoglucosiden aus Leitungswasser mittels GC-MS nach der Anreicherung durch GF liegt bei 0,1 mg/l. Einschränkend muß erwähnt werden, daß die GF nicht zur Aufarbeitung einer großen Zahl von Proben geeignet ist. Die Kapazität der von uns verwendeten GF-Anlage war begrenzt. Ein weiteres Problem stellten die erforderlichen Trocknungszeiten dar. In der Routineanalytik sind Probenvorbereitungszeiten von 48 oder 72 h kaum zu akzeptieren.

5.3.2 Anreicherung von APG mittels Festphasenextraktion (SPE)

Die Extraktion von Tensiden mittels SPE ist ein etabliertes Verfahren in der Wasseranalytik [Kiewiet und de Voogt, 1996]. Die große Zahl zur Verfügung stehender Adsorbentien bietet optimale Bedingungen zur Anpassung an das jeweilige Trennproblem. Umkehrphasen wie C8 und C18 [Cserhati und Forgacs, 1997], Polymerphasen [Ventura et al., 1991] und graphitierter Kohlenstoff [Crescenzi et al., 1995] haben sich zur Anreicherung nichtionischer Tenside bewährt.

5.3.2.1 Sorbensauswahl

Insgesamt wurden sieben Festphasen auf ihre Eignung zur Anreicherung von APG aus wäßrigen Proben getestet. Leitungswasser wurde mit Plantacare 818 UP dotiert, die Wiederfindungsraten nach Abschnitt 4.6.2 bestimmt. Unter den getesteten SPE-Phasen befanden sich neben RP-C18-Phasen wie Europrep 60-30 C18 und Polar Plus auch SDB-Phasen (Styrol-Divinylbenzol-Copolymerphasen) wie SDB1, SDB2 und ENV+. Zusätzlich wurden eine Mischphase, bestehend aus ENV+ und RP-C18-Material, von ICT und das graphitierte Material ENVI-Carb getestet. Aufgearbeitet wurden jeweils drei 100 ml-Proben einer Konzentration von 100 mg/l. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung. Als Blindwert wurde die Trockensubstanz ohne Anreicherung direkt hydrolysiert.

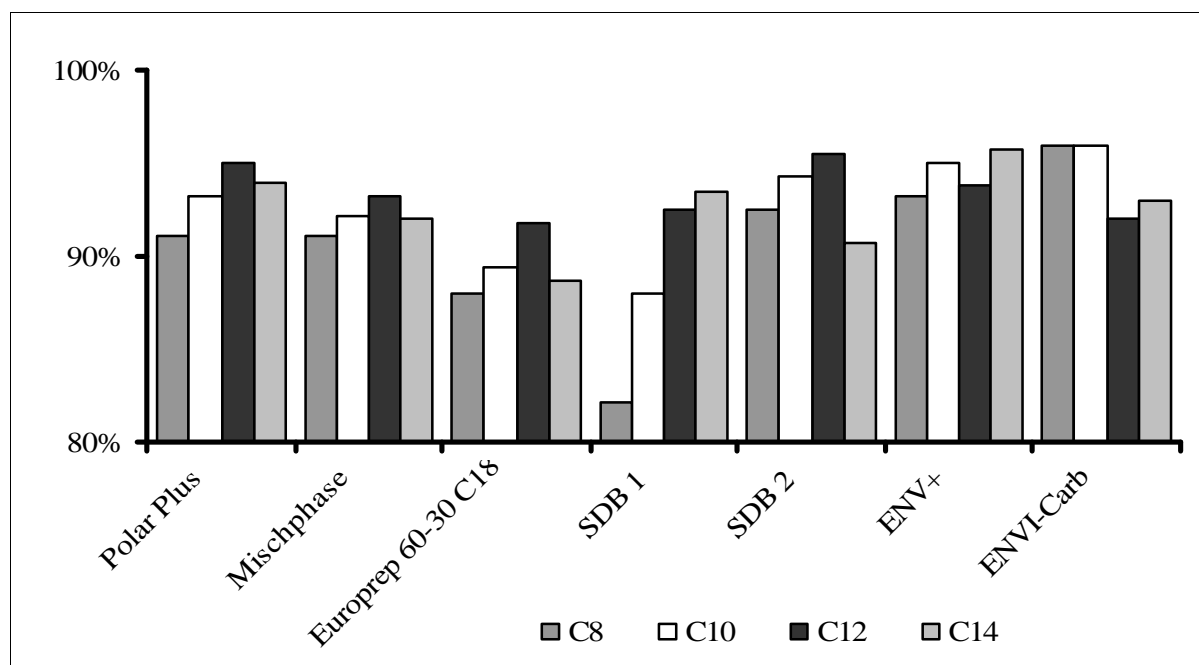


Abbildung 5-1: Vergleich der WF nach SPE mit unterschiedlichen Sorbentien

Probe: Plantacare 818 UP.

Alle Materialien zeigten eine sehr gute WF mit Werten oberhalb von 80 %. Die getesteten SPE-Phasen unterschieden sich nur unwesentlich in ihrer Fähigkeit, APG aus wäßrigen Proben anzureichern (Abbildung 5-1). Die Werte für die einzelnen Alkylkettenlängen reichen bei einer relativen Standardabweichung von 2-7 % von 82 % (SDB1, C8) bis 96 % (ENVI-Carb, C8 und C10). Während der Probenaufarbeitung waren jedoch erhebliche Unterschiede in der Handhabung der Phasen zu beobachten. SDB-Materialien ermöglichen große Durchflußraten. Ein großer Vorteil dieser Polymerphasen gegenüber Umkehr-Phasen ist die kurze Trocknungszeit. Erfahrungsgemäß sind 90 min völlig

ausreichend, um SDB-Phasen unter einem leichten Stickstoffstrom zu trocknen. Die Farbaufhellung der SDB-Phasen diente als Indikator für den Endpunkt der Trocknung. In diesem Punkt waren SDB-Phasen dem ENVI-Carb, bei dem ein Endpunkt der Trocknung nicht eindeutig erkannt werden konnte, überlegen.

Für alle weiteren Versuche wurde deshalb ENV+ zur Extraktion der Tenside verwendet. Über einen weiten Konzentrationsbereich wurden WF von knapp 90 % erreicht. Bei der Bestimmung von dotierten Leitungswasserproben mittels HPLC-MS konnten nach der Extraktion der Tenside mit ENV+ Nachweisgrenzen unterhalb von 1 µg/l erreicht werden (Kap. 5.8.2.2).

5.3.2.2 Optimierung der SPE-Bedingungen

In zahlreichen Einzelversuchen wurde die Extraktion mit ENV+ optimiert. Untersuchungen zur erforderlichen Sorbensmenge haben gezeigt, daß die WF von APG bei der Bestimmung von dotiertem Leitungswasser ab 200 mg ENV+ nicht mehr zunimmt. Verwendet man weniger als 100 mg in einer 6 ml-Kartusche, verringert sich die mittlere WF von Plantacare 818 UP auf unbefriedigende 50 %. Die geringe Füllhöhe führte zur Bildung von Kanälen im Füllbett, durch die die Analyten durchbrachen. Verwendet man 100 mg Sorbens in einer 3 ml-Kartusche, nimmt zwar die Füllhöhe zu, gleichzeitig sinkt aber die Tropfgeschwindigkeit merklich. Die Extraktionsdauer wird dadurch unnötig verlängert. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn 200 mg ENV+ in einer 6 ml-Kartusche zur Extraktion verwendet wurden.

Der Vergleich verschiedener Durchflußraten beim Aufbringen der Analyten auf das Sorbens bei konstanter Menge ENV+ ergab bis 15 ml/min keine signifikanten Unterschiede in den WF. Volumina bis 500 ml waren problemlos extrahierbar. Voraussetzung war, daß die eingesetzten 70 ml-Vorratsgefäße gründlich mit Wasser nachgespült wurden, um Adsorptionsverluste zu vermeiden.

Neben der verwendeten Festphase spielt in der SPE das Elutionsmittel eine wichtige Rolle. Beim Vergleich verschiedener Elutionsmittel wie Tetrahydrofuran, Chloroform, Acetonitril und Methanol erbrachte Methanol die besten WF. Wodarczak und Burford [1998] verwendeten 10 ml Methanol zur Elution der APG. Es wurden Versuche unternommen, das Elutionsvolumen auf ein Mindestmaß zu reduzieren. Dazu wurde Leitungswasser mit Plantacare 818 UP dotiert ($c = 100 \text{ mg/l}$), 100 ml Probe wurden aufgearbeitet. Das Methanol-Eluat wurde in 500 µl-Fractionen aufgefangen und mittels FIA-MS analysiert. Die Elutionsprofile

von C8G1, C12G1, C8G2 und C12G2 (Abbildung 5-2) zeigen, daß 2,5 ml Methanol genügen, um die Tenside vollständig zu desorbieren.

Der Vergleich der Profile zeigt, daß die Länge des Alkylrestes das Elutionsverhalten maßgeblich beeinflusst. Kurzkettige Verbindungen eluieren unter den gegebenen Bedingungen früher als APG-Komponenten mit langkettigen Alkylresten. So lassen sich in Fraktion 2 immerhin noch etwa 25 % der C12-Verbindungen nachweisen, während nur noch 5-10 % der C8-Verbindungen in der 2. Fraktion gefunden werden. In der letzten Fraktion (4,5-5 ml) konnten weniger als 0,05 % der Ausgangssubstanz nachgewiesen werden.

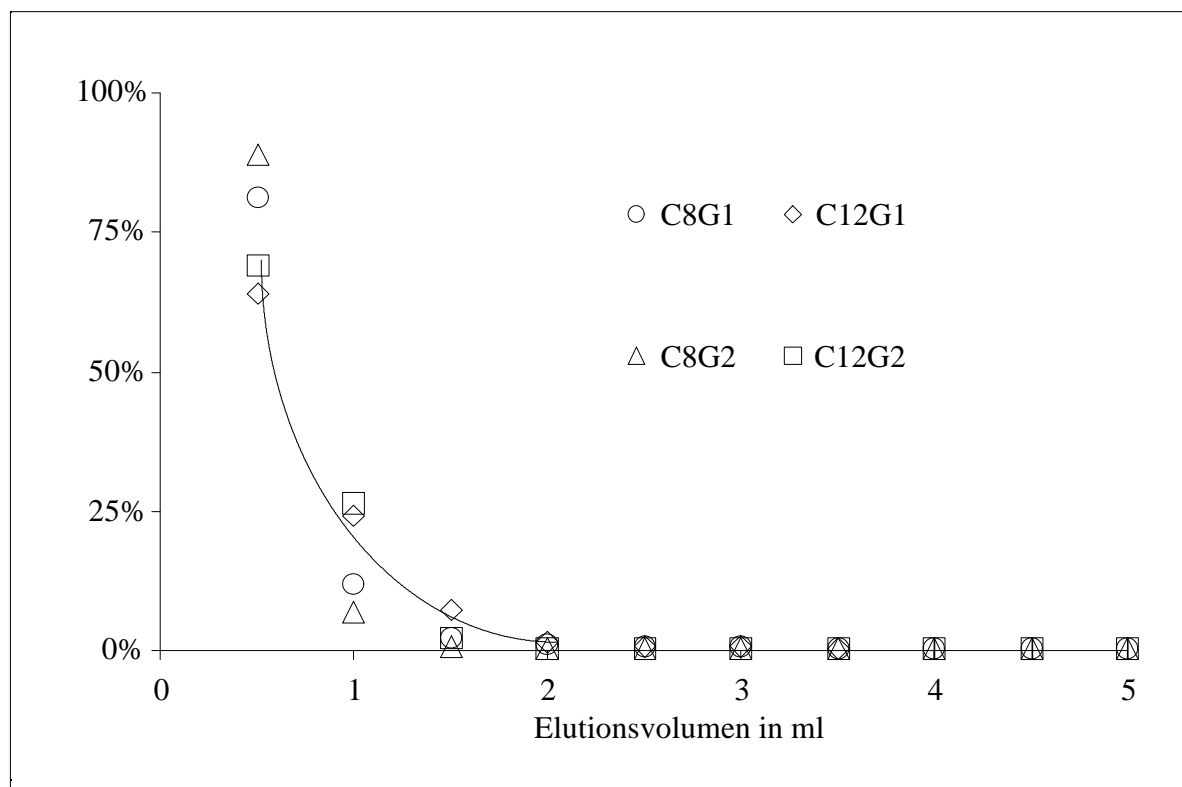


Abbildung 5-2: Elutionsprofil ausgewählter APG bei der Extraktion mit ENV+
Elutionsmittel: Methanol. Bestimmung der APG: FIA-MS.

Die Anreicherung von APG aus wäßrigen Matrices wurde in den weiteren Versuchen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Sorbens: 200 mg ENV+/6 m-Kartusche
 Probevolumen: ≤ 100 ml
 Durchflußrate: ≤ 15 ml/min
 Elutionsmittel: 2,5 ml Methanol.

5.3.2.3 Extraktion von APG aus Bioreaktorproben

Im Teilprojekt E3b wurde der Abbau von Restkonzentraten nichtionischer Tenside in Bioreaktoren untersucht, da es nicht in jedem Fall möglich sein wird, die Spülwässer bzw. die daraus gewonnenen Tensidkonzentrate einer Wiederverwendung zuzuführen. Es schien wirtschaftlich nicht vertretbar, diese Konzentrate nach einer Rückverdünnung in die kommunalen oder gewerblichen Kläranlagen zu leiten. Deshalb waren Abbaustudien für konzentrierte APG-Lösungen geplant. Zwar gelten APG als besonders leicht biologisch abbaubar, nur wenig ist aber über das Verhalten von Konzentraten bekannt war.

In Vorbereitung dieser Studien sollte eine entsprechende Analytik etabliert werden. Grundlagen und Instrumentarien für die ökologische Bewertung von Tensiden wurden von Schöberl [1997] beschrieben. DOC-Konzentrationen (gelöster organischer Kohlenstoff) von ca. 65-130 mg/l wurden als Betriebsbedingung für synthetisches Abwasser genannt. Dies entspricht einer Konzentration von etwa 100-200 mg/l APG. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß APG sehr schnell abgebaut werden, mußten analytische Methoden entwickelt werden, die eine Bestimmung der Tenside im Bereich von 1 mg/l erlauben. Zusätzliche Probleme wurden durch die begleitende Biomasse erwartet. Eine Abtrennung der bakteriellen Biomasse war dringend geboten; einerseits müssen die empfindlichen chromatographischen Geräte geschützt werden, andererseits stört die Matrix die qualitative und quantitative Bestimmung der Tenside.

Die direkte Anreicherung von APG aus dotierten Bioreaktorproben ohne Abtrennung der Biomasse ergab zumeist unbefriedigende WF. Bereits 5 ml Probe führten zum Verschuß der PTFE-Fritten. Eine Auswertung war nur für Proben möglich, die mit mehr als 1 g/l dotiert waren, da bei diesen Proben weniger als 1 ml extrahiert werden mußte. Die WF dieser Proben lagen im Mittel bei 85 % (n=3). Proben mit geringeren Konzentrationen ergaben dagegen mittlere WF unterhalb von 50 %, insbesondere länger-kettige APG zeigten unbefriedigende WF.

Bei einem geforderten Konzentrationsbereich von ~ 1 mg/l mußte die Biomasse also vor der SPE abgetrennt werden, um größere Probevolumina aufarbeiten zu können. Bioreaktorproben wurden mit Plantacare 818 UP im Bereich von 10-2000 mg/l dotiert. In parallelen Ansätzen wurde die Biomasse vor der nachfolgenden Festphasenextraktion durch Zentrifugation (5 min, 2000 min⁻¹) bzw. durch Membranfiltration (0,2 µm) abgetrennt.

Die Bestimmung der WF mittels GC-FID erbrachte nahezu identische Resultate wie jene Untersuchungen, bei denen die Biomasse vor der SPE nicht abgetrennt wurde. Oberhalb von 500 mg/l war die mittlere WF sehr gut, unterhalb von 200 mg/l nahm die WF sehr stark ab.

Obwohl der Vergleich von Zentrifugation und Membranfiltration keinen signifikanten Unterschied in den WF der APG ergab, wurde in den weiteren Versuchen die Zentrifugation zur Abtrennung der Biomasse eingesetzt, da ein Verstopfen der Membranfilter bei Aufarbeitung großer Probevolumina je nach Zelldichte der Bakterienkultur nicht ausgeschlossen werden konnte.

Als Ursache der geringen WF kamen ein schneller biologischer Abbau z.B. durch extrazelluläre Enzyme oder die Adsorption der Tenside an der Oberfläche der Biomasse in Betracht. Um einen eventuellen biologischen Abbau durch extrazelluläre Enzyme zeitlich verfolgen zu können, wurde der Überstand frischer Bioreaktorproben mit Plantacare 818 UP in drei Konzentration (10, 50 und 500 mg/l) dotiert. Die Biomasse wurde vor der Tensidzugabe durch Zentrifugation abgetrennt. In Abständen von 10 min wurden die Proben mit konzentrierter HCl versetzt und nach Kap. 4.6.2 aufgearbeitet. Im Ergebnis konnte keine zeitabhängige Abnahme der WF registriert werden, die mittleren WF lagen bei einer Standardabweichung von maximal 8 % über den betrachteten Zeitraum von 60 min bei ca. 85 %. Ein schneller Abbau durch extrazelluläre Enzyme konnte ausgeschlossen werden.

Als weiterer Weg des biologischen Abbaus war die Aufnahme der APG in die Bakterienzellen und die dortige Verstoffwechselung zu diskutieren. Die Biomasse wurde zur Untersuchung dieser Fragestellung durch Zusatz von Methanol (50 Vol. %) und in einem parallelen Versuch mit 0,1%iger NaN_3 -Lösung abgetötet. Vor der Zugabe von Plantacare 818 UP wurde der Alkohol destillativ entfernt und die Probe mit Leitungswasser aufgefüllt, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die Bestimmung der WF lieferte schon bekannte Ergebnisse. Höher konzentrierte Proben erbrachten gute WF, während in Proben, die mit weniger als 200 mg/l dotiert waren, z.T. nur 20 % der längerkettigen APG detektierbar waren.

Somit war klar, daß der biologische Abbau als alleinige Erklärung für die geringen WF nicht hinreichend war. In weiteren Ansätzen wurde der Einfluß der Adsorption der APG an der Zelloberfläche untersucht. Verschiedene organische Lösungsmittel wurden auf ihre Eignung getestet, APG von der Zelloberfläche zu desorbieren (Abbildung 5-3). Die Biomasse wurde mit 0,1%iger NaN_3 -Lösung abgetötet. Nach der Zugabe von Plantacare 818 UP ($c = 100 \text{ mg/l}$) wurden die Proben zentrifugiert und der wäßrige Überstand vorsichtig

abdekantiert. Die verbleibende Biomasse wurde anschließend mit verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen extrahiert. Danach wurde erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden nach dem Trocknen vereinigt. Die WF wurde als Summe beider Extraktionen mittels GC-FID bestimmt (vgl. Kap. 4.6.2).

Die Extraktion der toten Biomasse mit organischen Lösungsmitteln führte nicht zu einer signifikanten Erhöhung der WF. Mit Zunahme der Alkylkettenlänge verringert sich die WF bis unter 50 % (C12).

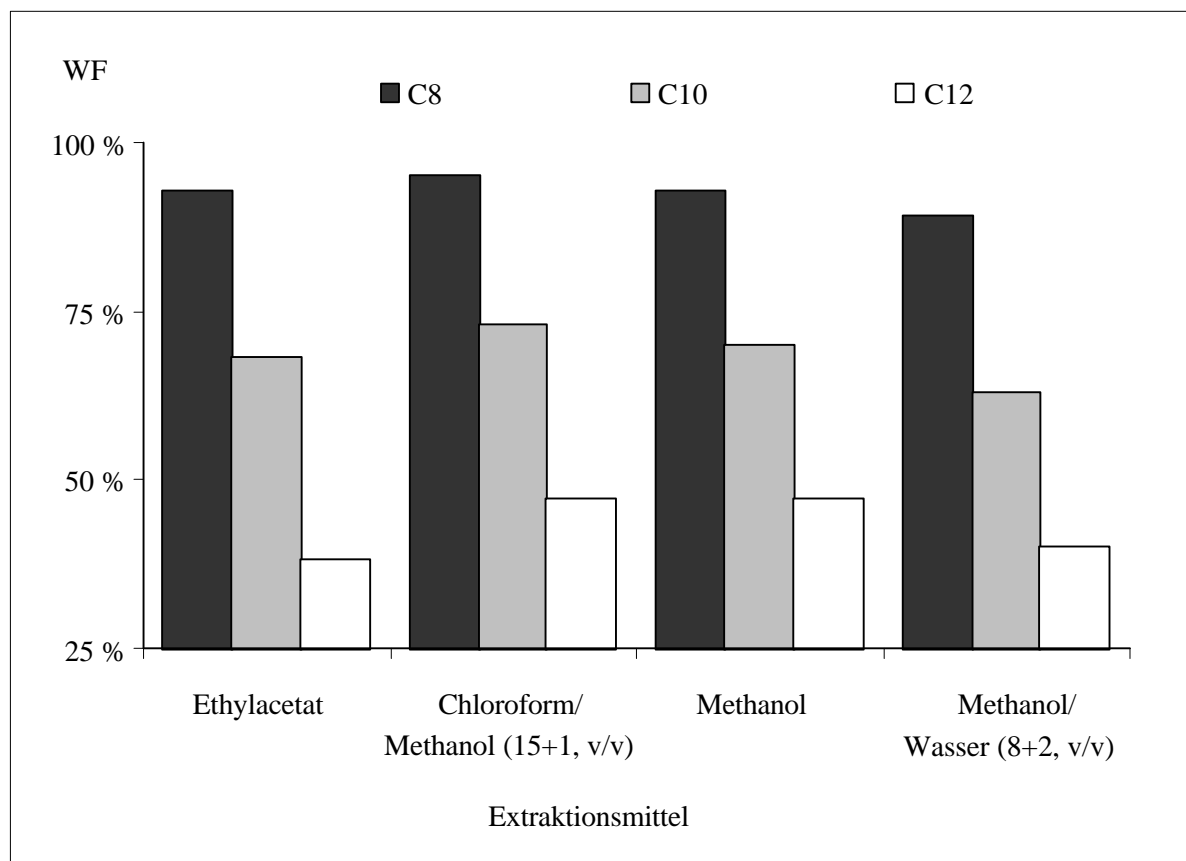


Abbildung 5-3: Desorption von APG von der Oberfläche toter Biomasse mit verschiedenen Lösungsmitteln

Abschließend muß festgestellt werden, daß der biologische Abbau von APG in Bioreaktoren nur unvollständig charakterisiert werden konnte. Die deutliche Verringerung der WF längerkettiger APG-Komponenten bei der Analyse von Bioreaktorproben könnte auf ihre irreversible Adsorption an die Oberfläche der Bakterien zurückgeführt werden. Die Abnahme des APG-Gehaltes in Gegenwart von tensidabbauenden Bakterienkulturen muß als Summe von biologischem Abbau und Adsorption betrachtet werden!

5.4 Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die HPTLC bietet dem analytischen Chemiker die Möglichkeit, Proben schnell, unkompliziert und zuverlässig auf ihre qualitative Zusammensetzung zu untersuchen.

5.4.1 Detektion von APG in der HPTLC

APG gehören zu den nichtionischen Tensiden, die keine Eigenfärbung, Fluoreszenz oder UV-Aktivität besitzen. Grundlage einer erfolgreichen HPTLC-Methode war demzufolge die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens zur Detektion der Tenside. Ziel war es, APG möglichst selektiv, gleichzeitig aber auch möglichst empfindlich zu detektieren. Matrixbestandteile sollten "unsichtbar" bleiben.

Prinzipiell lassen sich mittels HPTLC getrennte Verbindungen vor der Chromatographie (prächromatographisch) oder nach ihrer Trennung (postchromatographisch) mit Reagenzien umsetzen, so daß die Verbindungen auf der HPTLC-Platte sichtbar werden. Prächromatographische Derivatisierungen haben den Nachteil, daß die Derivate im Vergleich mit den ursprünglichen Analyten häufig völlig andere chromatographische Eigenschaften besitzen. Die Einführung eines weiteren Aufarbeitungsschrittes in die Analytik bedeutet zudem eine Verlängerung der Analysenzeit, die bei Screeningverfahren von besonderem Interesse ist.

Die postchromatographische Derivatisierung von dünnschichtchromatographisch getrennten Tensiden ist dagegen beim Nachweis von APG in Formulierungen weit verbreitet. Spilker et al. [1996] nutzten die zahlreichen vicinalen OH-Gruppen zur Detektion von APG aus. Ihnen gelang der Nachweis der Tenside mit Bleitetraacetat. Matrix wurde nur sehr wenig angefärbt. Ein Bedampfen der HPTLC-Platte mit Iod ließ weitere Inhaltsstoffe als gelbbraune Flecken sichtbar werden.

Das Besprühen der HPTLC-Platten mit Schwefelsäure und das anschließende Erhitzen läßt APG als dunkle Flecken sichtbar werden [Buschmann und Wodarzak, 1994]. Ein Gemisch aus Thymol, Ethanol und konzentrierter Schwefelsäure führt zu einer selektiven Anfärbung von APG. In Verbindung mit der AMD (Automated Multiple Development)-Technik konnten Klaffke et al. [1998] den Gehalt an APG in Pulverwaschmittel bestimmen.

In der Vorbereitungsphase des Projektbereiches E des Sfb 193 wurden erste Erfahrungen bei der Detektion dünnschichtchromatographisch getrennter Fettalkoholethoxylate (AEO) gesammelt [Billian, 1996; Heberer et al., 1997]. Die nichtionischen Tenside wurden mit Primulin angefärbt, die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenz bei 365 nm.

Grundlage dieser Detektion war die Reaktion des Indikators mit Kohlenwasserstoffketten, die mehr als sechs Kohlenstoff-Atome enthalten. Die Übertragung dieser Anfärbetechnik auf APG ergab wenig zufriedenstellende Ergebnisse. Während sich APG auf Kieselgel-Platten bis in Bereiche von 500 ng nachweisen ließen, war auf RP-C18-HPTLC-Platten mindestens 1 µg Substanz erforderlich, um die Spots vom Untergrund abzuheben. Die Oberfläche der RP-Platten selbst trat in Wechselwirkung mit dem Sprühreagenz.

In der Lebensmittelchemie sind zahlreiche Reagenzien zur Detektion von Zuckern und Zuckerderivaten bekannt [Stahl, 1967]. Das Anfärben mit einem Gemisch aus Diphenylamin, Anilin und Phosphorsäure (DAP) läßt APG nach 30minütigem Erhitzen der HPTLC-Platten bei 130°C als blau-schwarze Flecken sichtbar werden. Sowohl auf NP- als auch auf RP-HPTLC-Platten waren die Tenside bis unter 50 ng nachweisbar. Die Sprühlösung wurde hergestellt, indem 2 g Diphenylamin, 2 g Anilin und 10 ml 85%ige H₃PO₄ zu 100 ml mit Methanol aufgefüllt wurden. Im Kühlschrank war das DAP-Reagenz bis zu einem Jahr haltbar. Das Erhitzen der APG in Gegenwart von Phosphorsäure führt zur Bildung von Furfuralabkömmlingen. Im weiteren Verlauf entsteht daraus Furfural, das mit Aminen zu farbigen Schiffschen Basen reagiert (Abbildung 5-4). Die Detektion verläuft sehr selektiv, wie bei der Analyse von technischen APG-Gemischen und kosmetischen Erzeugnissen gezeigt werden konnte [Billian und Stan, 1998].

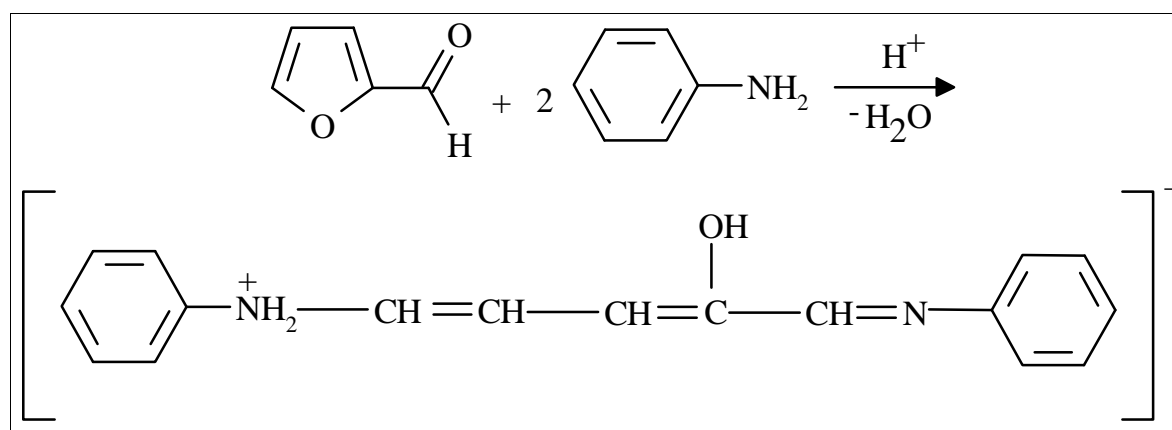


Abbildung 5-4: Farbreaktion nach Kakac und Veydelek [1974]

Die HPTLC wurde im Screening von Proben eingesetzt, quantitative Bestimmungen blieben die Ausnahme. Falls erforderlich, wurden parallel zu den Proben Standardgemische dünnschichtchromatographisch entwickelt. Die quantitative Auswertung erfolgte über eine externe Kalibrierung. Die Auftragung der Peakflächen gegen die absolute Menge an Referenzmaterial ergab eine zufriedenstellende Linearität. Im Bereich von 200-1500 ng

wurden Kalibriergeraden mit Regressionskoeffizienten $R^2 > 0,990$ erhalten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Response von monoglucosidischen und diglucosidischen Verbindungen registriert.

Kieselgel-Platten zeigten ein stärkeres Rauschen als RP-C18-HPTLC-Platten. Insbesondere beim Einsatz von NP-Phasen ist es wichtig, daß die Platten sofort nach dem Besprühen erhitzt werden, um eine Diffusion der Substanzbanden zu unterbinden.

5.4.2 HPTLC-Trennung von APG auf Normal- und Umkehrphasen

APG lassen sich nach ihrem chemischen Aufbau dünnschichtchromatographisch sowohl auf Normal-Phasen wie Kieselgel als auch auf Umkehr-Phasen wie RP-C2, RP-C8 oder RP-C18 analysieren. Während die Trennung auf Kieselgel hauptsächlich durch den Glucosidierungsgrad beeinflußt wird (Abbildung 5-5), erfolgt die Trennung an RP-Phasen in erster Linie nach der Länge des Alkylrestes.

Die getrennten Analyten wurden nach dem Anfärben mit DAP-Reagenz als blau-schwarze Flecken auf den HPTLC-Platten detektiert (Abbildung 5-6). Durch Abscannen der Bahnen mit Wolframlicht der Wellenlänge 540 nm und Messung des reflektierten Lichtes werden Remissions-Orts-Kurven, die HPTLC-Chromatogramme erhalten. Der Vergleich der R_f -Werte (Retention factor) von Analyt und Referenzsubstanz führte zur Identifizierung der einzelnen Komponenten. Das Ziel in der ersten Projektphase bestand in der Etablierung einfacher HPTLC-Methoden zur Bestimmung von APG. Verschiedene Laufmittelsysteme wurden auf ihr Vermögen zur Trennung von APG-Komponenten auf Kieselgel getestet. Die ermittelten R_f -Werte sind in Tabelle 5-3 zusammengefaßt.

Tabelle 5-3: NP-HPTLC von APG mit verschiedenen Laufmittelgemischen

Laufmittel	R_f -Wert		
	C10-OH*	C10-β-G1	C10-β-G2
CHCl ₃ /CH ₃ OH (1+1, v/v)	0,95	0,90	0,75
CHCl ₃ /CH ₃ OH/CH ₃ COOH/H ₂ O (40+5+4+1, v/v/v/v)	0,83	0,31	0,11
CHCl ₃ /C ₂ H ₅ OH/H ₂ O (30+20+2,5, v/v/v)	0,97	0,91	0,64
THF/CHCl ₃ /C ₄ H ₉ OH/CH ₃ COOH (62+27+8,5+2,5, v/v/v/v)	0,93	0,55	0,20

* Zur Detektion von n-Decanol (C10-OH) wurden die Kieselgel-Platten nach der Entwicklung zuerst mit einer 0,05%igen methanolischen Primulinlösung besprüht, die Detektion erfolgte durch Messung der Fluoreszenz bei 365 nm. Anschließend wurden die Analyten mit DAP-Reagenz angefärbt und detektiert.

Alle getesteten Laufmittel sind zur Trennung von APG auf Kieselgel-Platten geeignet. Da es mit THF/CHCl₃/C₄H₉OH/CH₃COOH (62+27+8,5+2,5; v/v/v/v) [Klaffke et al., 1998] zudem gelingt, anomere Verbindungen anzutrennen, d.h. eine Differenzierung von α - und β -Anomeren ist in begrenztem Umfang möglich, wurde die Bestimmung von APG an NP-Phasen in allen weiteren Untersuchungen mit diesem Laufmittelgemisch durchgeführt.

Verglichen mit der RP-HPTLC kam die NP-HPTLC jedoch selten zur Anwendung. Die Verteilung der einzelnen Glucosidierungsgrade in technischen Gemischen (Kap. 1.2.1) ist so unterschiedlich, daß Proben in mehreren Konzentrationen auf die HPTLC-Platten aufgebracht werden mußten, wodurch die zu analysierende Probenzahl stark limitiert wurde.

Sehr viel häufiger wurde die Umkehrphasen-HPTLC eingesetzt. Je nach Länge des Alkylrestes bilden sich unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der RP-Phase aus. Innerhalb von 30 min lassen sich komplexe APG-Gemische vollständig nach dem Alkylrest auftrennen. Di- und oligoglucosidische Komponenten erscheinen aufgrund ihrer höheren Polarität als Schweif vor den Monoglucosiden gleicher Alkylkettenlänge. Eine quantitative Bestimmung technischer APG-Gemische ist wegen der unzureichenden Auflösung nicht möglich. Die Trennleistung läßt sich mittels AMD-Technik erhöhen, allerdings ist dies mit einer erheblichen Ausdehnung der Analysenzeit verbunden.

Bei einer Laufmittelzusammensetzung CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (90+10+1, v/v/v) wurden die besten Resultate erzielt (Abbildung 5-7). Die Analyten werden gleichmäßig über die gesamte Trennstrecke verteilt. Die Erhöhung des Wasseranteils im Laufmittel verändert das Retentionsverhalten der APG erheblich. Die Laufstrecken der Verbindungen können sich soweit verringern bis schließlich bei einem Wasseranteil von 25 % die langkettigen Komponenten C12 und C14 den Startfleck nicht mehr verlassen. Demgegenüber verbessert sich gleichzeitig die Trennung zwischen Mono- und Diglucosiden der kurzkettigen APG (Abbildung 5-8). Während bei der Laufmittelzusammensetzung CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (90+10+1, v/v/v) die Differenz der Laufstrecken von C10G1 und C10G2 nur 3 mm beträgt, verdoppelt sich dieser Wert beim Laufmittel CH₃OH/H₂O/CH₃COOH (75+25+1, v/v/v). Eine Differenzierung zwischen verschiedenen Decyl-Diglucosiden anhand ihrer Laufstrecken wird möglich, eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen ist wegen fehlender Referenzmaterialien ohne weitere spektroskopische Untersuchungen jedoch nicht möglich.

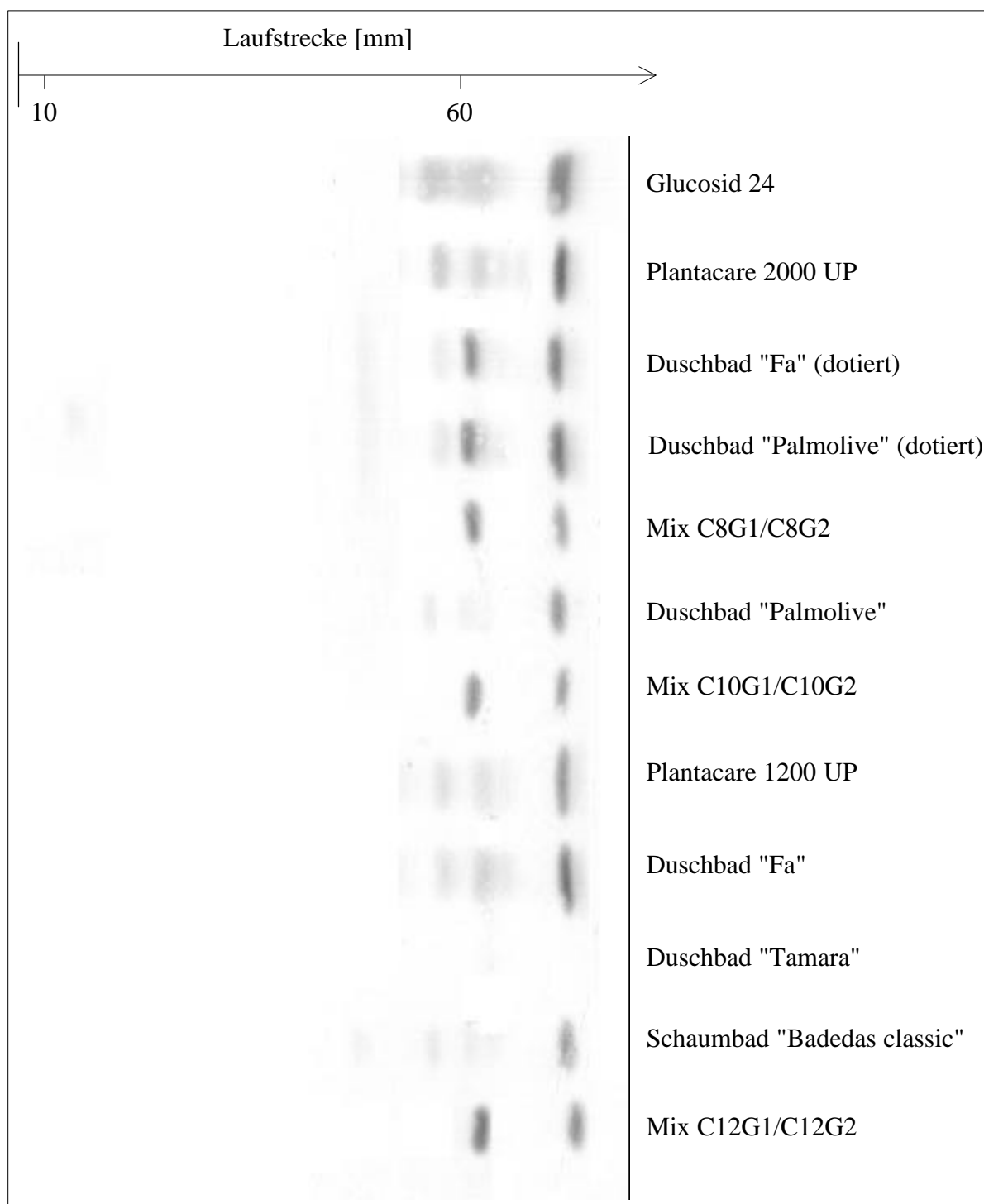


Abbildung 5-5: NP-HPTLC technischer und kosmetischer Formulierungen - Detektion von Alkylpolyglucosiden mit DAP-Reagenz

Kieselgel 60 F₂₅₄. Laufmittel: CHCl₃/CH₃OH (50+50, v/v).

Detektion mit DAP-Reagenz. Proben: siehe Beschriftung.

Mix C_nG1/C_nG2: Mix von Alkylmono- und diglucosiden gleicher Alkylkettenlänge.

Fa-/Palm.-Duschbad dotiert: Aufstockung der Kosmetika mit dem Mix C10G1/G2.

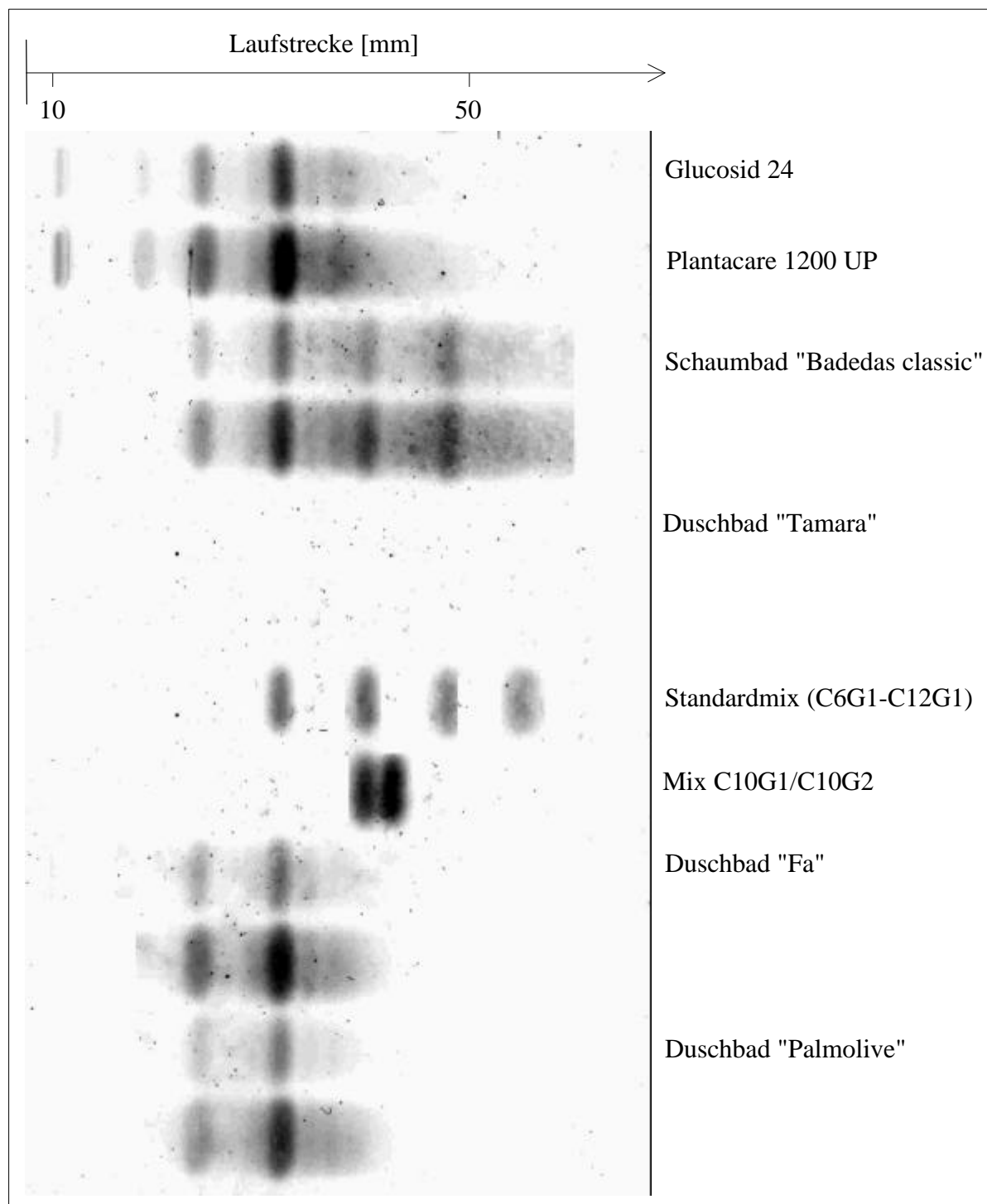


Abbildung 5-6: RP-HPTLC technischer und kosmetischer Formulierungen -

Detektion von Alkylpolyglucosiden mit DAP-Reagenz

RP-C18. Laufmittel: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (90+10+1, v/v/v).

Proben: siehe Beschriftung. Die kosmetischen Proben wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen.

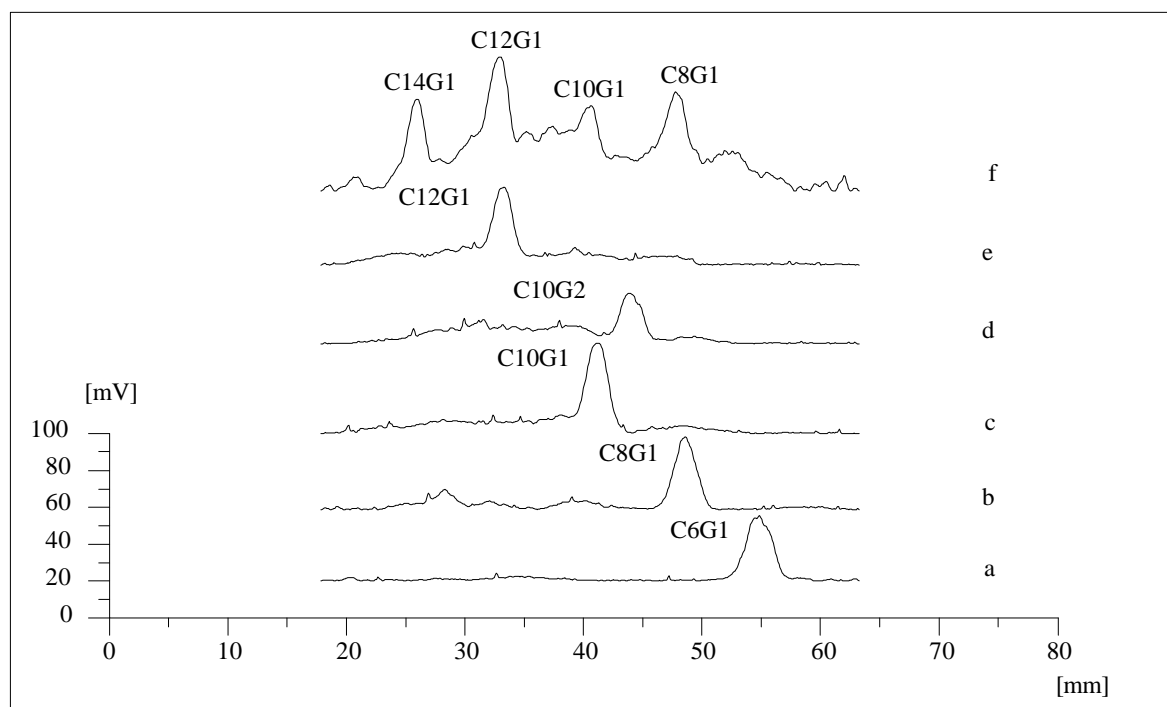


Abbildung 5-7: Trennung von APG mittels RP-C18-HPTLC

Laufmittel: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (90+10+1, v/v/v).

Detektion mit DAP-Reagenz ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

Bahn a-e: Referenzsubstanzen, Bahn f: Plantacare 818 UP.

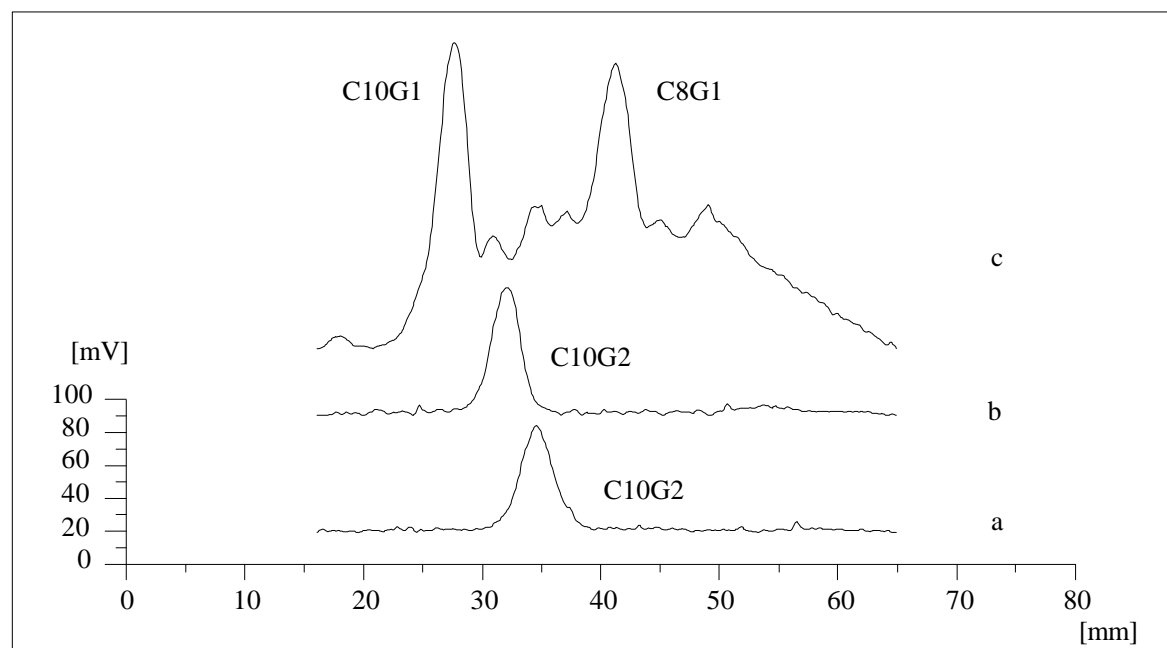


Abbildung 5-8: Trennung von Decyl-Diglucosiden mittels RP-C18-HPTLC

Laufmittel: $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{COOH}$ (75+25+1, v/v/v).

Detektion mit DAP-Reagenz ($\lambda = 540 \text{ nm}$).

a, b = Fraktionen der RP-C8-HPLC; c = Glucopon 225 (Originalprobe).

Schließlich wurden auch zweidimensionale DC-Platten (Alltech, Unterhaching, D) auf ihre Fähigkeit zur vollständigen Charakterisierung von APG-Gemischen getestet. Dabei handelt es sich um DC-Platten, auf denen RP-C18-Material als 3 cm breiter Streifen und Kieselgel kombiniert vorliegen. Nach einer ersten Entwicklung auf dem RP-C18-Streifen und dem Trocknen der Trennphase wurden die DC-Platten um 90° gedreht und dann auf Kieselgel entwickelt. Das Ergebnis der Trennungen von APG-Gemischen war aber unbefriedigend. Einerseits war die Trennleistung des DC-Materials völlig unzureichend, andererseits konnte nur eine Probe pro DC-Platte analysiert werden.

5.5 Fließinjektionsanalyse mit massenselektiver Detektion (FIA-MS)

Die FIA-MS bietet die Möglichkeit innerhalb kürzester Zeit eine große Zahl an Einzelkomponenten zu identifizieren und zu quantifizieren. Ohne chromatographische Auftrennung wurden die Tenside direkt in die Ionenquelle transferiert. Charakteristische Ionen dienen zum Nachweis der einzelnen Komponenten. Das verwendete Quattro LC Massenspektrometer von Micromass (Manchester, UK) verfügt über die beiden Techniken Elektrospray (ESI) und Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI).

5.5.1 Optimierung der Ionisationsbedingungen

Die vier möglichen Ionisationsformen (ESI+, ESI-, APCI+ und APCI-) wurden auf ihre Eignung zur Detektion von APG getestet. Prinzipiell kann festgestellt werden, daß APG mit jeder der vier Techniken detektierbar waren. Die positiven Ionisationsformen hatten allerdings den Nachteil, daß sich leicht Adduktionen bildeten, insbesondere Na^+ -Addukte. MS/MS-Untersuchungen waren dann nicht mehr möglich, da die Ladung nach der Fragmentierung am Natrium verbleibt und die interessierenden Fragmente als Neutralteilchen nicht detektiert werden (Abbildung 5-9).

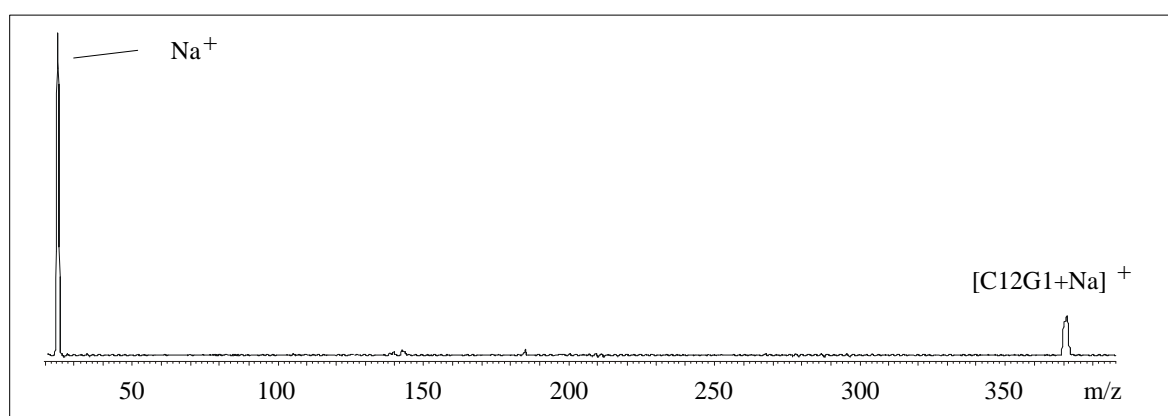


Abbildung 5-9: Positives ESI-MS/MS-Spektrum von C12G1

Im negativen Modus von ESI und APCI ist die Neigung zur Bildung von Adduktionen deutlich schwächer ausgeprägt. Es werden lediglich Anlagerungsprodukte von Ameisensäure und Methanol gefunden. Während die Methanoladdukte durch die Wahl einer höheren Cone-Spannung beseitigt werden können, sind Formiataddukte derart stabil, daß nur eine sorgfältige Reinigung des MS-Systems Abhilfe schafft.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit erfolgte die Ionisierung der APG bei der FIA, wie auch später bei der Bestimmung der APG nach HPLC-Trennung, im negativen Modus des APCI, weil im negativen Modus des Elektrospray nur dann annehmbare Empfindlichkeiten erreicht wurden, wenn den Proben vor der Analyse NH_3 zugesetzt wurde. Offensichtlich führt die Veränderung des pH-Wertes zur "Ionisierung" der APG-Moleküle. Diese "APG-Ionen" werden im Elektrospray-Modus benötigt, da im Gegensatz zur APCI-Technik nur Substanzen detektiert werden, die bereits als Ionen in Lösung vorliegen.

Die Ionisierung wird durch drei Parameter entscheidend beeinflusst. Bereits geringe Abweichungen vom Optimum lassen die Analyten "unsichtbar" werden. Das elektrische Potential an der Entladungsnadel (Corona) hat direkten Einfluß auf die Ionenausbeute. Bei konstanter Probe-Temperatur und konstanter Cone-Spannung erreichen die Peakflächen eines mittels FIA-MS untersuchten Standardgemisches ($c = 100 \text{ mg/l}$) bei einer Spannung von 3,3 kV ein Maximum. Unterhalb von 2,7 kV verringern sich die Peakflächen auf etwa 75 %, während eine Steigerung der Corona-Spannung über 3,3 kV keine signifikante Änderung der Peakflächen zur Folge hat. Das Optimum der Probe-Temperatur liegt bei 400°C. Gegenüber einer Temperatur von 200°C verdoppelten sich die Peakflächen der untersuchten APG C8G1, C10G1, und C12G1 sowie C8G2, C10G2 und C12G2.

Der Einfluß der Probe-Temperatur und der Spannung an der Corona-Entladungsnadel ist aber klein im Verhältnis zum Einfluß der Cone-Spannung. Diese Spannung sorgt für die senkrechte Ablenkung des Ionenstrahls in den Hochvakuumteil des MS. In Abbildung 5-10 sind die detektierten Peakflächen ausgewählter APG als Ergebnis von fünf verschiedenen Cone-Spannungen dargestellt. Alkyldiglucoside weisen im Bereich von 40 V ein Maximum der Peakflächen auf (Abbildung 5-10A). Unterhalb dieser Spannung werden zahlreiche Adduktionen registriert, während eine Erhöhung der Spannung auf mehr als 40 V eine Fragmentierung der Moleküle im Übergangsbereich von Normaldruck- zu Hochvakuumbereich des MS auslöst. Noch deutlicher ist der Einfluß auf die Ionisierung von monoglucosidischen Komponenten (Abbildung 5-10B). Der Verlauf der Peakflächenintensität der Monoglucoside

besitzt ein ausgeprägtes Maximum bei 25-30 V. Bereits eine geringe Erhöhung auf 35 V löst eine Fragmentierung der Verbindungen in der Ionenquelle aus.

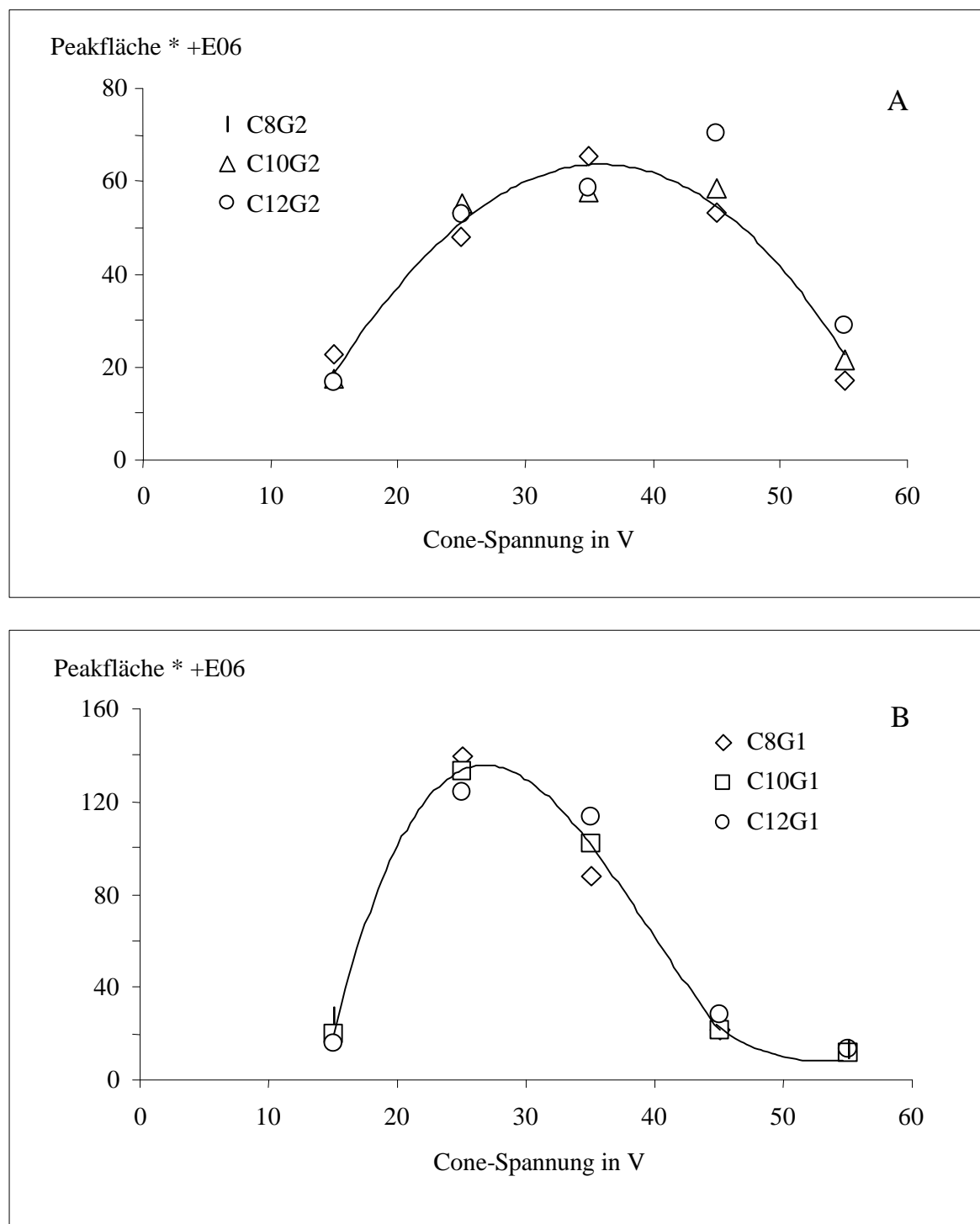


Abbildung 5-10: Einfluß der Cone-Spannung auf die Detektion von APG

FIA-MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 285-585$). Cone: 15-55 V.
A = Alkyldiglucoside; B = Alkylmonoglucoside.

Für alle weiteren Experimente wurde eine Cone-Spannung von 40 V gewählt. Damit war gewährleistet, daß bei hoher Empfindlichkeit nur wenige Addukt- und Fragmentionen

gebildet werden. Allerdings handelt es sich um einen Kompromiss. So verringern sich bei einer Cone-Spannung von 40 V die absoluten Werte der Peakflächen, insgesamt aber sind die resultierenden Massenspektren "sauberer". Wie Abbildung 5-11 zeigt, ist es notwendig, diese verhältnismäßig hohe Cone-Spannung einzustellen, um die Bildung von Adduktionen weitgehend zu unterdrücken. Dies ist in der FIA-MS besonders wichtig, da die Identifizierung der Verbindungen wegen der fehlenden Chromatographie einzig über ihr Masse/Ladungs-Verhältnis erfolgt. Um falsche Befunde auszuschließen ist es erforderlich, die Zahl der gleichzeitig in der Ionenquelle vorliegenden Ionen bzw. Quasimolekülonen auf die zu detektierenden Analyten zu begrenzen. Bei einer Cone-Spannung von 40 V treten weniger „Störsignale“ auf. Eine eindeutige Identifizierung der APG wird somit möglich.

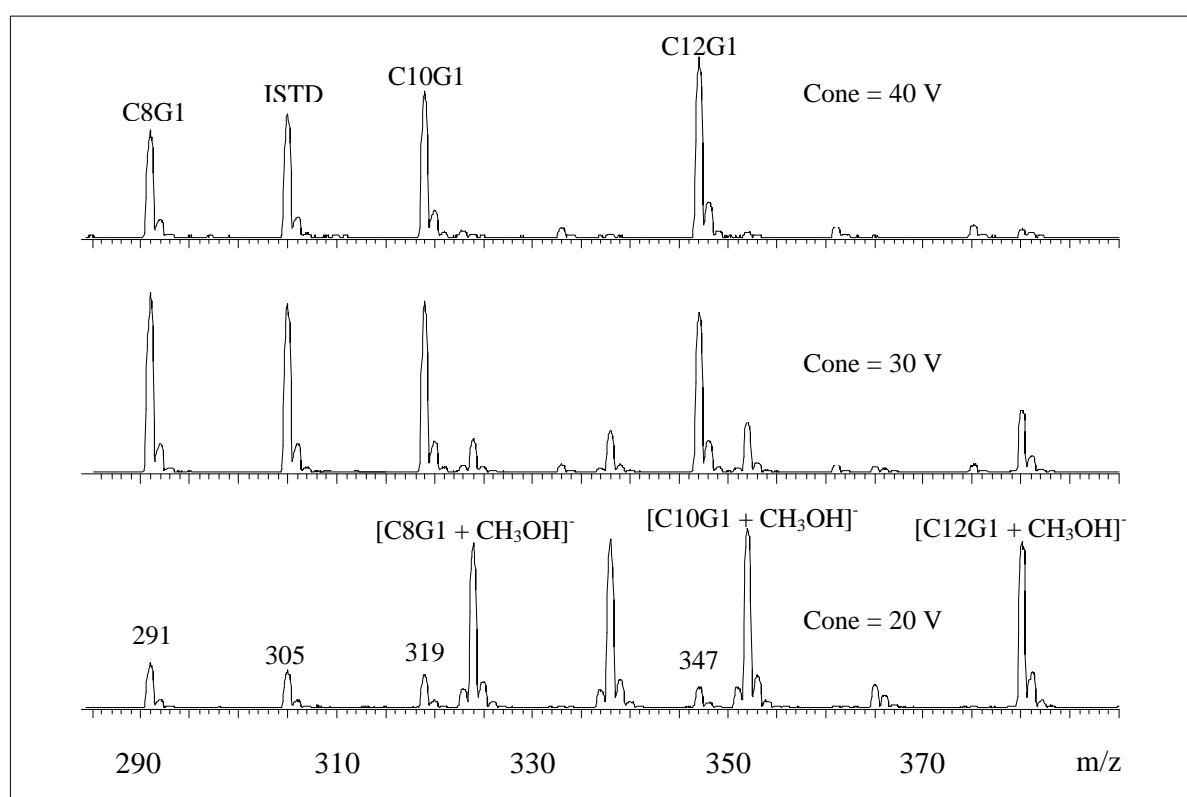


Abbildung 5-11: Bildung von Adduktionen in Abhängigkeit von der Cone-Spannung
FIA-MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 280-390$). Cone: 20, 30, 40 V.

Die für die Bestimmung von APG mittels FIA-MS optimierten Parameter sind im folgenden noch einmal zusammengefaßt:

1. APCI-Probe-Temperatur: 400°C
2. Corona-Spannung: 3,3 kV
3. Cone-Spannung: 40 V

Neben den genannten Parametern wird die Ionenausbeute in der APCI durch eine Reihe weiterer Faktoren beeinflusst. Insbesondere die Ionenquelle bzw. die Sauberkeit ihrer inneren Oberfläche hatte großen Einfluß auf die Detektion der Tenside. Bereits kleinste Rückstände von Ameisensäure führten zu unreproduzierbaren Meßwertschwankungen, was den Einsatz eines ISTD unumgänglich machte. Ebenso wichtig wie die Sauberkeit des MS-Systems ist die Regulierung der Gasflüsse (Nebulizer, Drying). Ziel ist es, die Analyten reproduzierbar in die Gasphase zu überführen, um eine gleichmäßige Ionisierung zu erreichen. War der Gasfluß zu gering, bildeten sich in der Ionenquelle Tröpfchen oder die Vernebelung war ungleichmäßig. Ein zu hoher Gasfluß verringerte dagegen die Empfindlichkeit der MS-Detektion. Mit einem Nebulizer Gas Flow von 600 l/h und einem Drying Gas Flow von 250 l/h wurden sowohl in der FIA-MS als auch später in der Kopplung von HPLC und MS die besten Ergebnisse erzielt. In Abbildung 5-12 ist ein typisches Massenspektrum eines technischen APG-Gemisches nach Fließinjektion dargestellt. Entsprechend der Ionisierung im negativen Modus des APCI werden die Tenside über ihre Quasimolekülonen $[M-H]^-$ identifiziert. Jede der detektierten Massen muß als Gemisch verschiedener Isomere aufgefaßt werden, da in der FIA keine chromatographische Trennung isomerer Komponenten stattfindet.

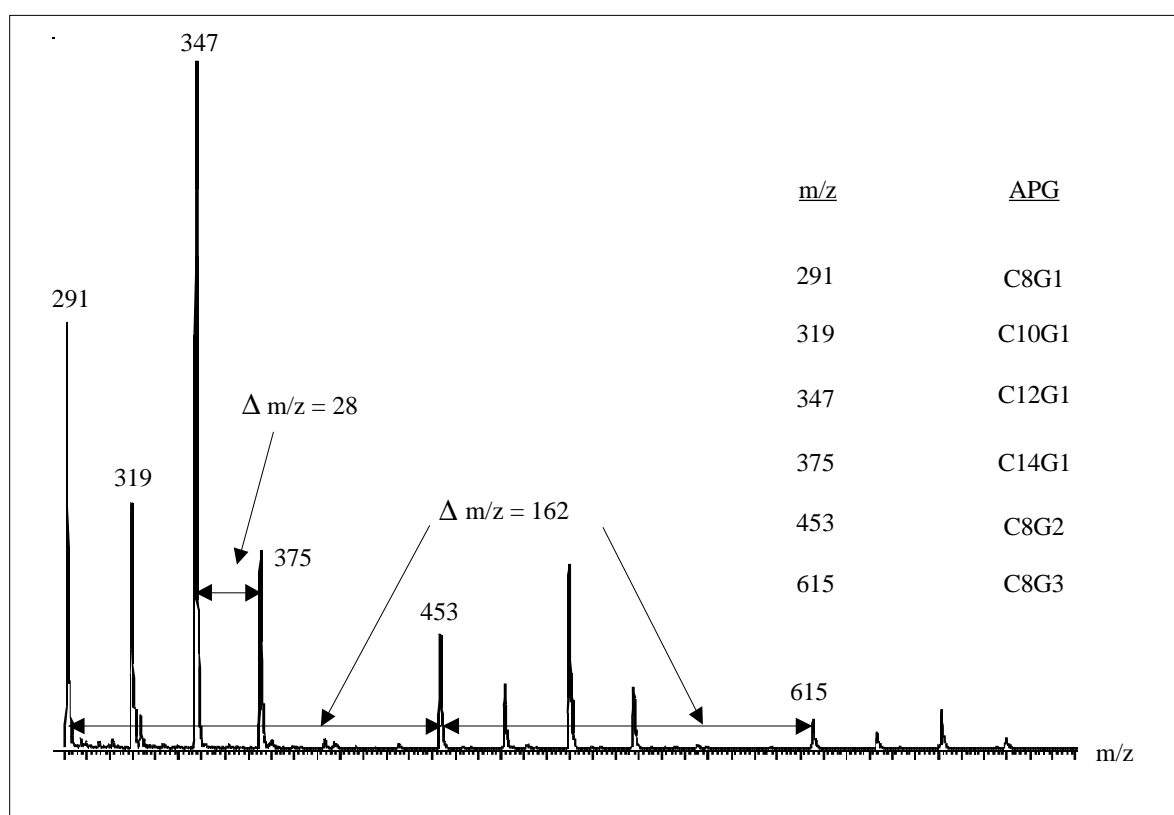


Abbildung 5-12: APCI-Massenspektrum von Plantacare 818 UP

FIA-MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 285-735$).

Plantacare 818 UP enthält vier verschiedene Alkylreste (C8-C14), im Massenspektrum sind Komponenten, die bis zu drei Glucoseeinheiten enthalten, zu erkennen. Charakteristisch sind die Differenzen $m/z = 28$, die dem Massenunterschied im Alkylrest um eine C_2H_4 -Einheit entspricht, und $m/z = 162$ ($291 \rightarrow 453 \rightarrow 615$), gleichbedeutend mit einer zusätzlich gebundenen Glucoseeinheit. Prinzipiell sind auch noch höher glucosidierte Komponenten detektierbar, allerdings ist deren Konzentration in technischen APG-Gemischen so klein, daß die Analyse dieser Verbindungen die Injektion sehr hoch konzentrierter Proben erfordert.

5.5.2 Screening von Proben nach Anreicherung mit Membranfiltration

Die entwickelte FIA-MS-Methode eignet sich besonders zur Untersuchung des Alkylkettenpektrums. Abbildung 5-13 zeigt die Veränderung der Alkylkettenverteilung von APG-Gemischen nach ihrer Anreicherung an einer Polyethersulfon (PES)-membran.

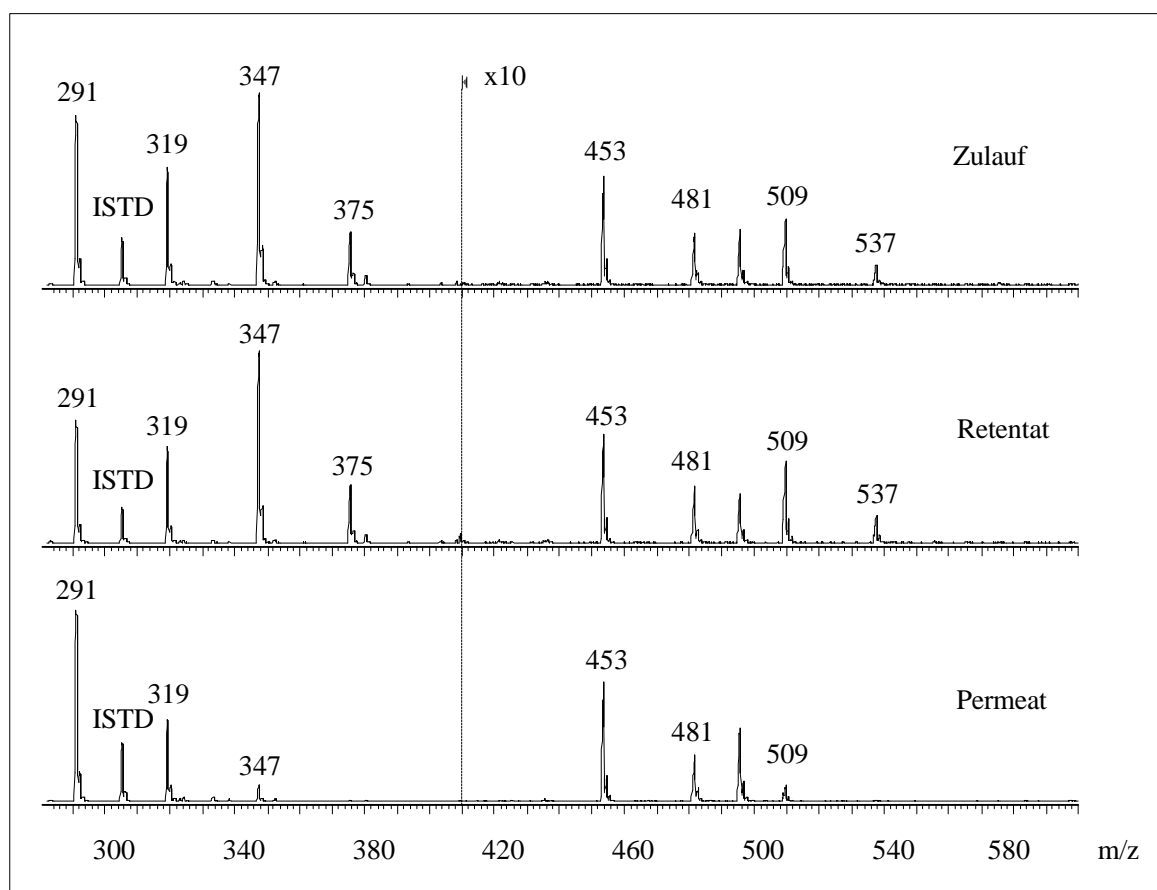


Abbildung 5-13: Veränderung des Alkylkettenpektrums von APG-Gemischen bei Anreicherung mittels Membranfiltration

FIA-MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 285-600$, $m/z = 410-600 \times 10^1$).
 Membran: Polyethersulfon (Molecular Weight Cut Off: 5 kDa).
 Probe: Plantacare 2000 UP.

Die Membranfiltration mit PES-Material führt zu einer starken Veränderung in der Zusammensetzung des APG-Gemisches. Im Permeat kommt es zu einer Anreicherung kurzkettiger APG. Infolge ihrer hohen kritischen Micellbildungskonzentration gelangen diese Komponenten durch die Membran. Im Gegensatz dazu bilden länger-kettige APG Micellen, die an der PES-Membran zurückgehalten werden. Dadurch kommt es zu einer Aufkonzentrierung der länger-kettigen Verbindungen im Retentat, wobei Mono- und Diglucoside das gleiche Verhalten zeigen.

5.5.3 Quantifizierungen von APG in matrixarmen Proben

Die Selektivität der MS-Detektion ist durch die Wahl der Ionisierungsparameter so hoch, daß der Gehalt von APG in Proben der Kooperationspartner im Sfb 193 oftmals direkt nach Fließinjektion ermittelt werden konnte. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung, Meßwertschwankungen wurden über den ISTD C9G1, dessen Endkonzentration in der Probe 10 mg/l betrug, ausgeglichen. Das Standardgemisch enthielt neben den Monoglucosiden C8, C10 und C12 die entsprechenden Diglucoside sowie die Verbindung C14G2. Wegen der relativ großen Schwankungen wurde die Linearität des Meßsignals anhand der Mittelwerte dreier Messungen je Konzentrationsniveau ($c = 5-100$ mg/l) ermittelt. Das Signal erwies sich über den gesamten Arbeitsbereich für alle untersuchten Analyten als linear mit Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,997$. Abbildung 5-14 zeigt die Kalibriergeraden ausgewählter APG.

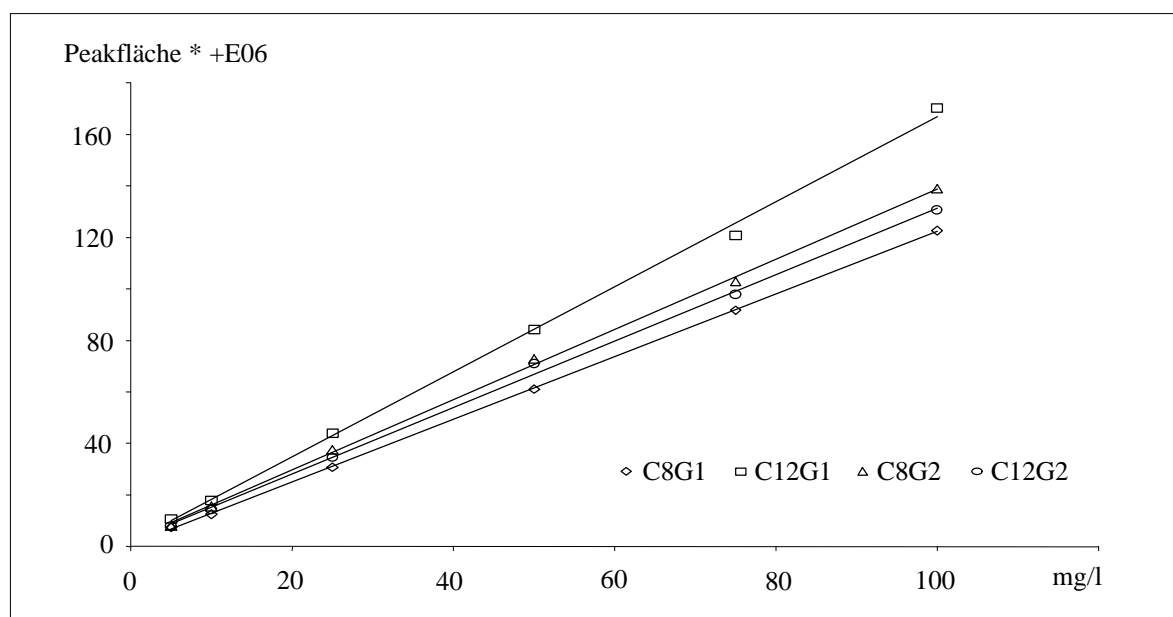


Abbildung 5-14: Kalibriergeraden einiger APG bei der FIA-MS-Analyse

3 Bestimmungen je Meßpunkt ($c = 5-100$ mg/l).

Die Bestimmungsgrenzen wurden anhand der kleinsten Konzentration, bei der die Verbindungen noch sicher detektiert werden konnten, abgeschätzt. Für die verschiedenen Referenzsubstanzen ergaben sich Bestimmungsgrenzen von etwa 1 mg/l. Oberhalb einer Konzentration von 250 mg/l war eine Bestimmung der APG mittels FIA-MS nicht möglich, weil der lineare Bereich der Kalibriergeraden überschritten war.

5.5.4 Tandem-Massenspektrometrie nach Fließinjektion (FIA-MS/MS)

Angesichts der Tatsache, daß APCI-Massenspektren relativ fragmentarm sind, ist es von besonderem Vorteil, wenn die Quasimoleküle bzw. Parent-Ionen durch Kollision mit Inertgasen gezielt in typische Fragmente zerlegt werden können. Einerseits läßt sich damit die Identität von nachgewiesenen Analyten zusätzlich absichern, andererseits besteht die Möglichkeit über die Erzeugung von charakteristischen Bruchstücken Aussagen zur chemischen Struktur der Analyten zu treffen. Im Fall des eingesetzten Triple-Quadrupol-Gerätes wird das Parent-Ion mit dem ersten Massenfilter selektiert, anschließend gelangt es in die mit Argon gefüllte Kollisionszelle. Die Stoßaktivierung führt zum Zerfall des Moleküls, dem sogenannten Collision Induced Decay (CID). Nach der Fokussierung gelangen die Fragmentionen in den dritten Quadrupol, wo sie entsprechend ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses getrennt werden.

Die Stärke der Fragmentierung wird durch den Druck in der Kollisionszelle und die Geschwindigkeit der Parent-Ionen bestimmt. Bei einer konstanten Kollisionsenergie (CE) von 20 eV wurden die Intensitäten der Fragmente der Referenzsubstanz C10G2 verglichen. Dabei konnte festgestellt werden, daß unter 0,0005 mbar keine deutliche Fragmentierung des Moleküls stattfindet. Bei einer Steigerung auf 0,0013 mbar findet man neben dem Parent-Ion ($m/z = 481$), dessen Intensität auf 50 % reduziert ist, und dem um eine Glucoseeinheit verkleinerten Fragmention $m/z = 319$, bereits zahlreiche Fragmente im Massenbereich von $m/z = 60-179$. Eine weitere Erhöhung des Druckes in der Kollisionszelle bewirkt keine zusätzliche Fragmentierung.

Der Einfluß der CE ist in Abbildung 5-15 dargestellt. Bei konstantem Druck in der Kollisionszelle ($p = 0,0013$ mbar) wurde das Molekülion von C10G2 ($m/z = 481$) verschiedenen Kollisionsenergien unterworfen. 10 eV sind unzureichend, bei dieser CE wird im MS/MS-Spektrum fast ausschließlich das Parent-Ion wiedergefunden. Mit der Verdopplung der CE auf 20 eV nimmt die Intensität des Parent-Ions erheblich ab, dafür sind im MS/MS-Spektrum zahlreiche Fragmente im Bereich von $m/z = 60-179$, sowie das charakteristische

Fragment mit $m/z = 319$, das durch die Abspaltung von Glucose entsteht, zu beobachten. Untersuchungen zum Fragmentierungsverhalten oligomerer APG haben gezeigt, daß die Abspaltung von Glucoseeinheiten typisch für höher glucosidierte APG ist. Bei einer Erhöhung der CE auf 30 eV findet eine noch stärkere Fragmentierung statt. Das größte noch zu detektierende Ion besitzt die Masse 161. Das entspricht genau einer Glucoseeinheit, von der ein Wassermolekül abgespalten ist. Die übrigen Fragmente ($m/z = 59-119$) eignen sich für eine Identifizierung von APG, sie sind aber zu wenig spezifisch für den Nachweis einzelner APG-Komponenten.

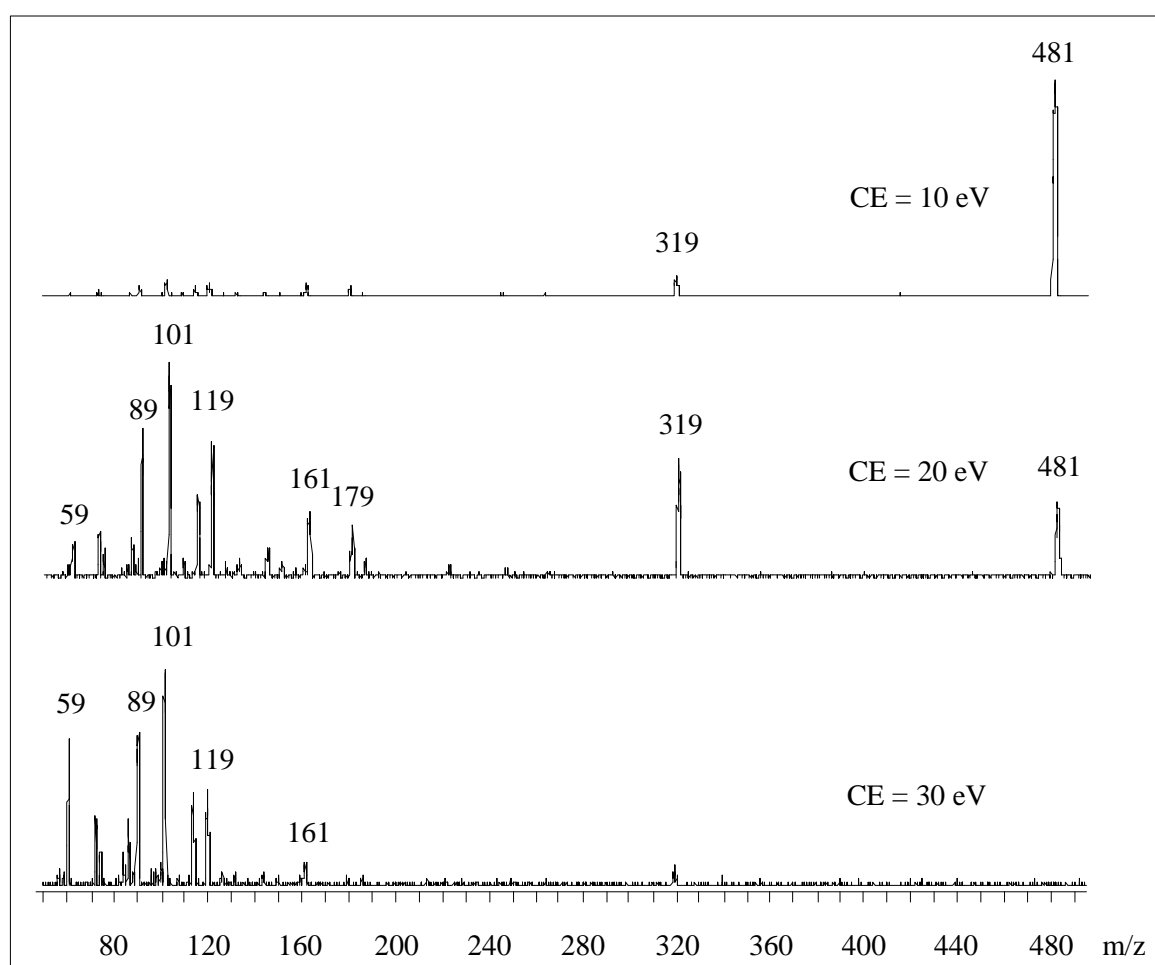


Abbildung 5-15: Einfluß der Kollisionsenergie auf die Fragmentierung von C10G2

FIA-MS/MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 50-500$). Kollisionsgas Argon ($p = 0,0013$ mbar). Oben: CE = 10 eV, Mitte: CE = 20 eV, Unten: CE = 30 eV.

Da ein Hauptziel der MS/MS-Untersuchungen darin bestand, Analysenergebnisse zu verifizieren, wurde in den weiteren Tandem-MS-Analysen bei einer CE von 17 eV (monoglucosidische APG), 25 eV (Diglucoside) und 40 eV (Oligoglucoside) gearbeitet. Damit war sichergestellt, daß bei ausreichend hoher Empfindlichkeit auch größere Fragmente erhalten bleiben, die eine eindeutige Identifizierung der APG ermöglichen.

Anomere Referenzsubstanzen wie C10- α -G1 und C10- β -G1 liefern nahezu identische Tochterionen-Spektren (Abbildung 5-16). Basepeak beider Anomere ist das Ion $m/z = 101$. Mit geringerer Intensität folgen die Fragmente $m/z = 71$, 85 und 113. Der Vergleich der beiden Tochterionenspektren zeigt lediglich geringe Unterschiede in der Intensität einzelner Ionen. Da aber nicht auszuschließen ist, daß es sich um zufällige Unterschiede handelt, ist es unmöglich einen Zusammenhang zwischen der anomeren Struktur der jeweiligen Komponente und ihrem MS/MS-Spektrum herzustellen.

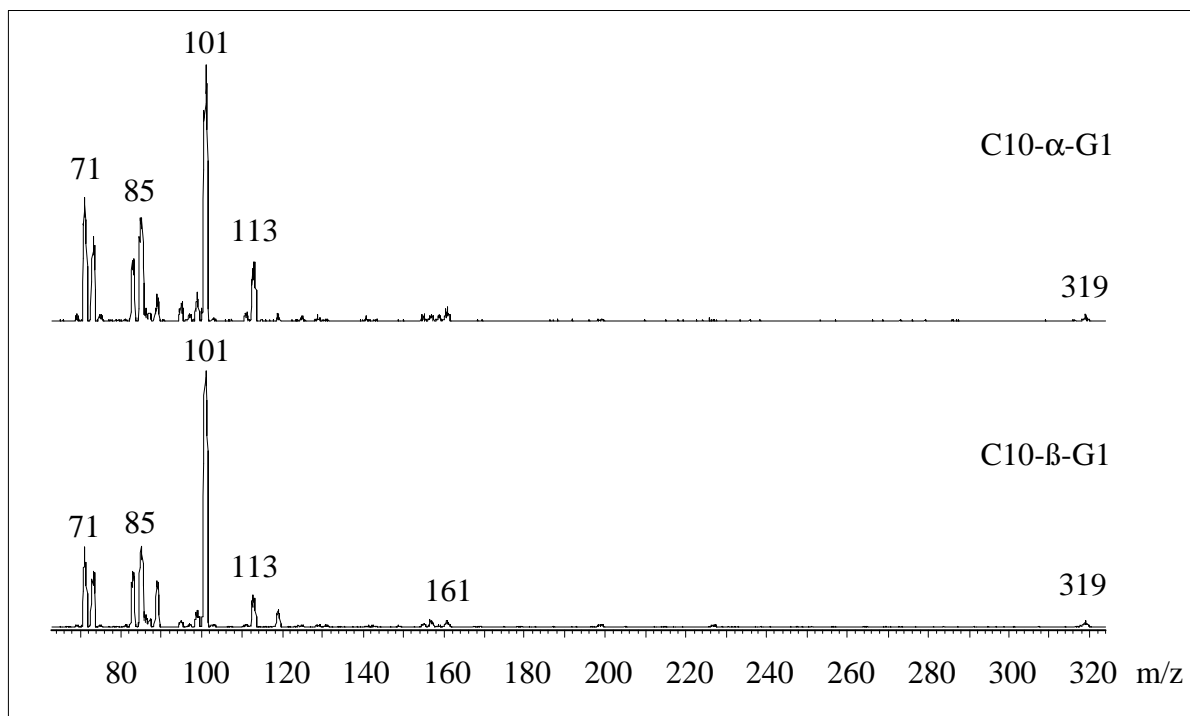


Abbildung 5-16: Vergleich der MS/MS-Spektren anomerer Alkylmonoglucoside

FIA-MS/MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 60-325$).
Kollisionsgas Argon ($p = 0,0013$ mbar).

Die Gegenüberstellung von MS/MS-Spektren von APG unterschiedlichen Glucosidierungsgrades ergibt deutliche Unterschiede in der Intensität wichtiger Fragmente (Abbildung 5-17). Diglucoside besitzen zwar mit $m/z = 101$ den gleichen Basepeak wie monoglucosidische APG (siehe auch Abbildung 5-16), danach folgen in der Reihenfolge ihrer Intensität aber die Fragmente $m/z = 89$ und 119. Im MS/MS-Spektrum von C8G3 sind grundsätzlich die gleichen Fragmente wie im MS/MS-Spektrum von C8G2 zu finden, Basepeak der dreifach glucosidierten Komponente ist bei der gewählten CE von 40 eV jedoch das Ion $m/z = 89$.

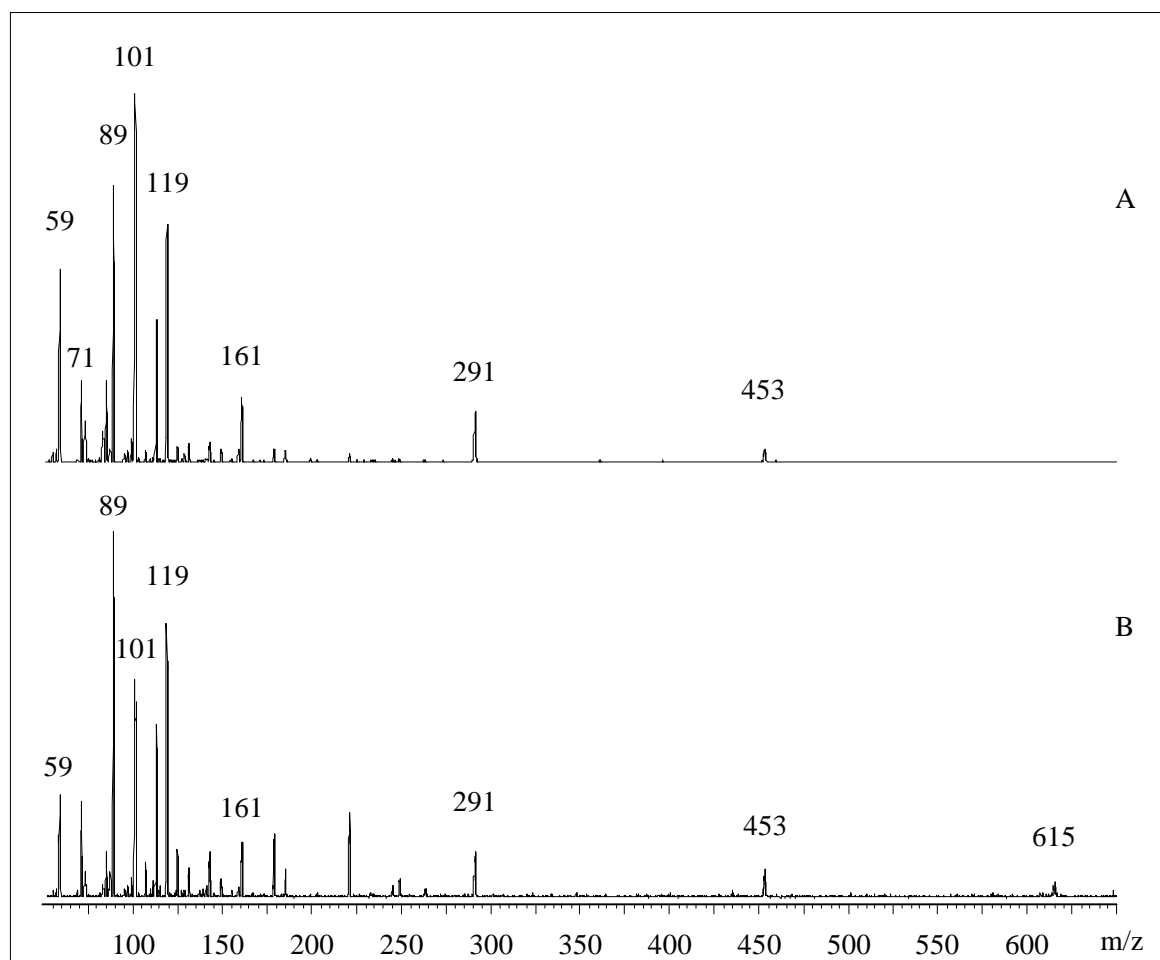


Abbildung 5-17: MS/MS-Spektren von C8G2 und C8G3

FIA-MS/MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, m/z = 50-650).
 Kollisionsgas Argon (p = 0,0013 mbar). Probe: Glucopon 225.
 A: C8G2 (CE = 25eV); B: C8G3 (CE = 40eV).

Wie sich im Verlauf dieser Arbeit herausgestellt hat, bestehen MS/MS-Spektren von APG fast komplett aus Fragmenten, die aus dem Kohlenhydratanteil der Moleküle hervorgehen, wie der Vergleich der MS/MS-Spektren der in der Alkylkette vollständig deuterierten Verbindung C8G1 mit der undeuterierten Form bestätigt (Abbildung 5-18). Alle Ionen mit der Masse m/z = 60-179 resultieren aus dem hydrophilen Glucoserest. Während die Quasimolekül-Ionen der beiden Komponenten den erwarteten Massenunterschied von 17 Da ($C_8H_{17} \rightarrow C_8D_{17}$) aufweisen, lassen sich unterhalb von m/z = 161 keine Unterschiede im Fragmentierungsmuster ausmachen.

Eine Differenzierung einzelner Komponenten hinsichtlich der Alkylkette kann nur über das Parent-Ion erfolgen. Mit Ausnahme des Molekülions und den Fragmenten, die durch Abspaltung von Glucoseeinheiten entstehen, konnten in keinem der MS/MS-Spektren eindeutige Hinweise auf den gebundenen Alkylrest gefunden werden. Ursache dafür ist, daß

der Alkylrest offensichtlich sehr leicht abgespalten wird, er aber nicht in der Lage ist, eine Ladung zu tragen, die für die massenspektrometrische Detektion erforderlich ist. Untersuchungen mit reinen Fettalkoholen haben dies bestätigt.

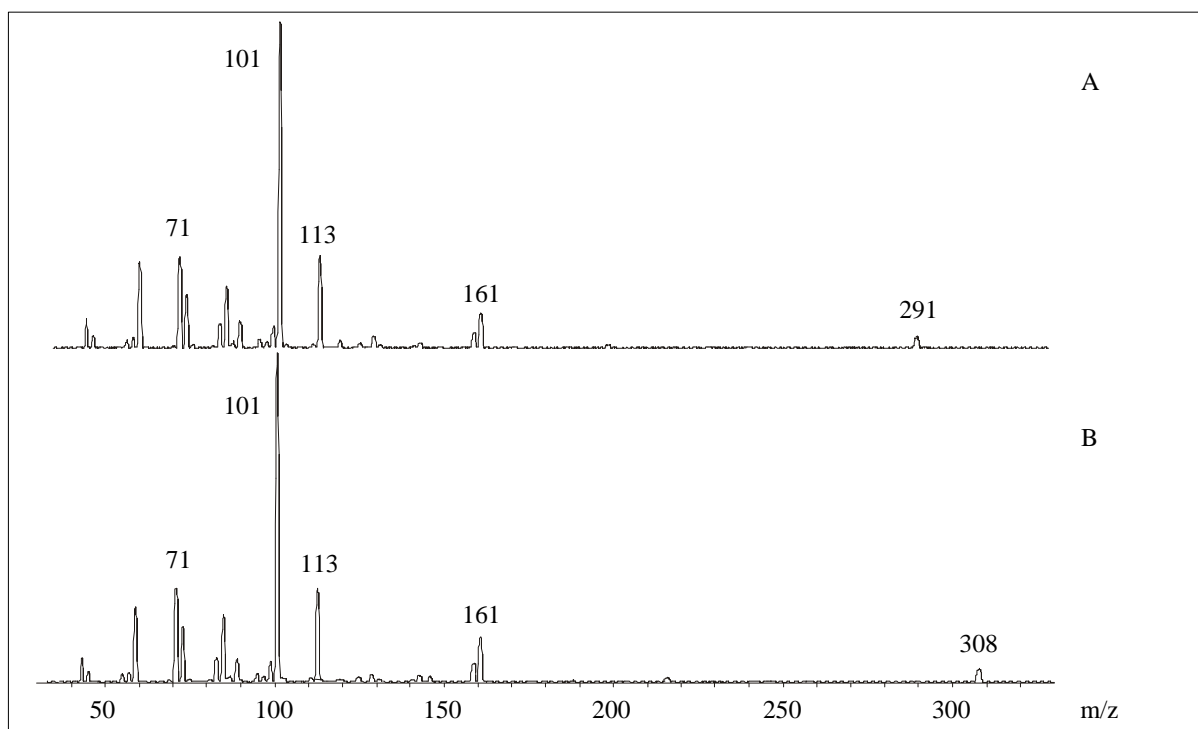


Abbildung 5-18: Vergleich der MS/MS-Spektren von C8H17G1 und C8D17G1

FIA-MS/MS (APCI-). MCA-Modus (30 s, $m/z = 30-320$).

Kollisionsgas Argon ($p = 0,0013$ mbar). CE = 17 eV.

A: Octyl- β -Monoglucosid (C8H17G1). B: Octyl-d₁₇- β -Monoglucosid (C8D17G1).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß APG auch in Gegenwart komplexer Matrix anhand charakteristischer MS/MS-Spektren eindeutig identifiziert werden können. Allerdings bleibt die Aufklärung der chemischen Struktur unbekannter APG-Komponenten über MS/MS-Spektren wegen der fehlenden Spezifität der Fragmente ungelöst. Isomere können ohne den Einsatz anderer Analysemethoden nicht unterschieden werden. Aussagen zum Alkylrest sind nur über das Parent-Ion möglich.

5.6 Bestimmung von APG mittels GC-MS

Die GC ist hinsichtlich der Trennkapazität die leistungsfähigste der derzeit angewandten analytischen Methoden. Aus bisher publizierten Arbeiten [Spilker et al., 1996; Waldhoff et al., 1997] war bekannt, daß die GC, insbesondere als Hochtemperatur-GC in der Lage ist, APG nach Derivatisierung nach Alkylrest, Glucosidierungsgrad und nach verschiedenen Strukturmerkmalen (Anomere, Ringisomere) zu trennen. Eine eindeutige Identifizierung

gaschromatographisch getrennter Einzelkomponenten ist möglich, wenn die GC mit der massenselektiven Detektion gekoppelt wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine GC-MS-Methode entwickelt werden, mit der auch APG-Komponenten identifiziert werden können, die nicht als Referenzsubstanz vorhanden sind. Charakteristische Fragmente in den EI-Spektren silylierter APG, wie $m/z = 204$ und 217 ermöglichen die Zuordnung furanosider und pyranosider Ringstrukturen. Typische Homologenreihen liefern Informationen über den Alkylrest. Die charakteristischen Ionen wurden zur Bestimmung der Retentionszeit von jenen APG verwendet, die nicht als Referenzmaterial vorhanden waren, aber in technischen und kosmetischen Produkten zu erwarten waren.

Die Quantifizierung wurde auf die monoglucosidischen Komponenten beschränkt, weil höher glucosidierte Verbindungen nicht zufriedenstellend gaschromatographierbar waren.

5.6.1 Derivatisierung

Blau und Halket [1993] geben in ihrem Standardwerk "Handbook of Derivatives for Chromatography" eine umfassende Übersicht zu gebräuchlichen Derivatisierungen für die Gaschromatographie. Bereits 30 Jahre vorher beschrieben Sweeley et al. [1963] die gaschromatographische Trennung von Trimethylsilylderivaten (TMS) von Zuckern und polyhydroxilierten Substanzen. Dejongh et al. [1969] analysierten die TMS-Derivate von Zuckern mittels GC-MS.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden APG erfolgreich mit Reacta Sil[®] und BSTFA derivatisiert. Reacta Sil[®] bezeichnet ein kommerziell erhältliches Gemisch aus Trimethylchlorsilan, Hexamethyldisilazan und Pyridin (1+2+10). Die getrockneten Proben wurden mit 100 µl des Reagenzgemesches versetzt und 20 s geschüttelt. Nach 60 min war die Reaktion bei Raumtemperatur beendet. Bei der Verdünnung mit Ethylacetat ausfallendes Ammoniumchlorid wurde durch Zentrifugation abgetrennt. Ein Aliquot der Lösung wurde in den GC injiziert.

Alternativ dazu wurden APG auch mit BSTFA derivatisiert. Die Umsetzung war bei einer Temperatur von 95°C nach 60 min vollständig. Im Vergleich beider Derivatisierungen werden APG bei der Reaktion mit Reacta Sil[®] thermisch weniger stark belastet, allerdings konnte bei der Bestimmung des APG-Gehaltes kosmetischer Proben gezeigt werden, daß die Umsetzung mit BSTFA selektiver verläuft. APG werden mit BSTFA komplett silyliert, d.h. alle aciden Protonen des APG-Moleküls werden durch TMS-Gruppen ersetzt (Abbildung 5-19).

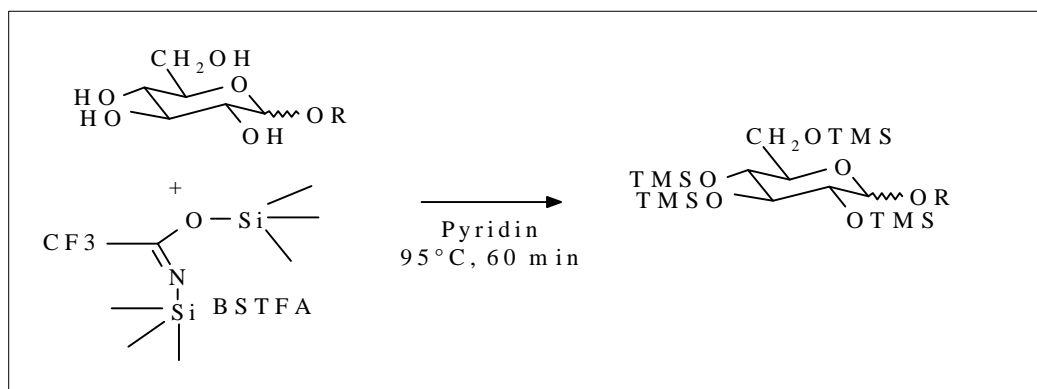


Abbildung 5-19: Reaktion von Alkylmonoglucosiden mit BSTFA

Die Vollständigkeit der Umsetzung technischer APG-Gemische wurde mittels GC-MS überprüft. Im Totalionenchromatogramm (TIC) waren lediglich die TMS-Derivate zu erkennen, underivatisierte APG wurden nicht gefunden.

5.6.2 GC-MS von APG-Trimethylsilyl-Derivaten

Die gaschromatographische Trennung der APG-TMS-Derivate wurde mit einer HP 5 Kapillarsäule durchgeführt. Abbildung 5-20 zeigt das TIC von mit BSTFA silyliertem Plantacare 818 UP. Die TMS-Derivate der Alkylmonoglucoside werden in 16 min nach der Länge des Alkylrestes getrennt. Außerdem lassen sowohl Anomere als auch Ringisomere unterscheiden.

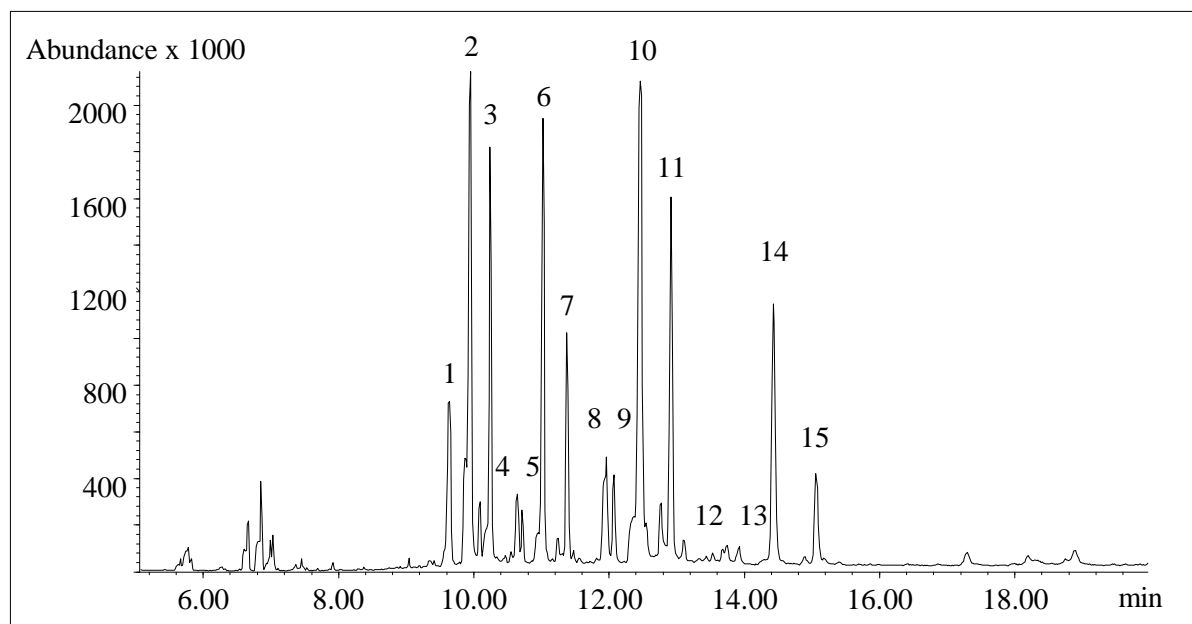


Abbildung 5-20: GC-EI-MS-Chromatogramm von Plantacare 818 UP

TIC (m/z = 50-650). Injektion: 0,2 mg Trockensubstanz nach Silylierung mit BSTFA. Peaks 1-15: Siehe Auflistung in Tabelle 5-4.

In Tabelle 5-4 sind die detektierten TMS-Derivate in ihrer Elutionsreihenfolge aufgelistet. Insgesamt wurden 15 APG-Komponenten detektiert, wobei die Trennung der Anomere kurzkettiger Alkylfuranoside nicht erreicht werden konnte.

Tabelle 5-4: Elutionsreihenfolge der APG-TMS-Derivate

Peak	Rt [min]	TMS-Derivat
1	9,64*	Octyl- α -Monoglucofuranosid
1	9,64*	Octyl- β -Monoglucofuranosid
2	9,96	Octyl- α -Monoglucopyranosid
3	10,26	Octyl- β -Monoglucopyranosid
4	10,65**	Decyl- α -Monoglucofuranosid
5	10,72**	Decyl- β -Monoglucofuranosid
6	11,03	Decyl- α -Monoglucopyranosid
7	11,39	Decyl- β -Monoglucopyranosid
8	11,96	Dodecyl- α -Monoglucofuranosid
9	12,08	Dodecyl- β -Monoglucofuranosid
10	12,46	Dodecyl- α -Monoglucopyranosid
11	12,92	Dodecyl- β -Monoglucopyranosid
12	13,72	Tetradecyl- α -Monoglucofuranosid
13	13,97	Tetradecyl- β -Monoglucofuranosid
14	14,45	Tetradecyl- α -Monoglucopyranosid
15	15,08	Tetradecyl- β -Monoglucopyranosid

* Peak 1: Co-Elution von Octyl- α -Monoglucofuranosid und Octyl- β -Monoglucofuranosid.

** Peak 4 und 5: teilweise Co-Elution.

Obwohl einige der aufgelisteten APG nicht als Referenzmaterial erhältlich sind, bereitete die Identifizierung der Verbindungen keine Probleme. Über charakteristische Fragmente in den EI-Spektren ließen sich alle Komponenten eindeutig identifizieren. Die Massenspektren von vier Alkylmonoglucosiden sind in Abbildung 5-21 dargestellt. Das intensivste Ion in den Spektren der Pyranoside (B, C, D) ist $m/z = 204$, während Furanoside (A) über den Basepeak $m/z = 217$ zu identifizieren sind. Beide Ionen tauchen auch in den Spektren des jeweils anderen Ringisomers auf, jedoch mit deutlich geringerer Intensität. Vergleicht man die EI-Spektren von Verbindungen mit unterschiedlichem Alkylrest (C, D), so findet man typische Fragmente wie $m/z = 287$ und 315 . Die Massendifferenz von 28 Da entspricht genau dem Unterschied einer C_2H_4 -Einheit im Alkylrest der APG. Ebenfalls zur Identifizierung des Alkylrestes geeignet sind die Ionen 531 und 559, deren Massendifferenz von 28 Da wiederum dem Unterschied einer C_2H_4 -Einheit im Alkylrest entspricht.

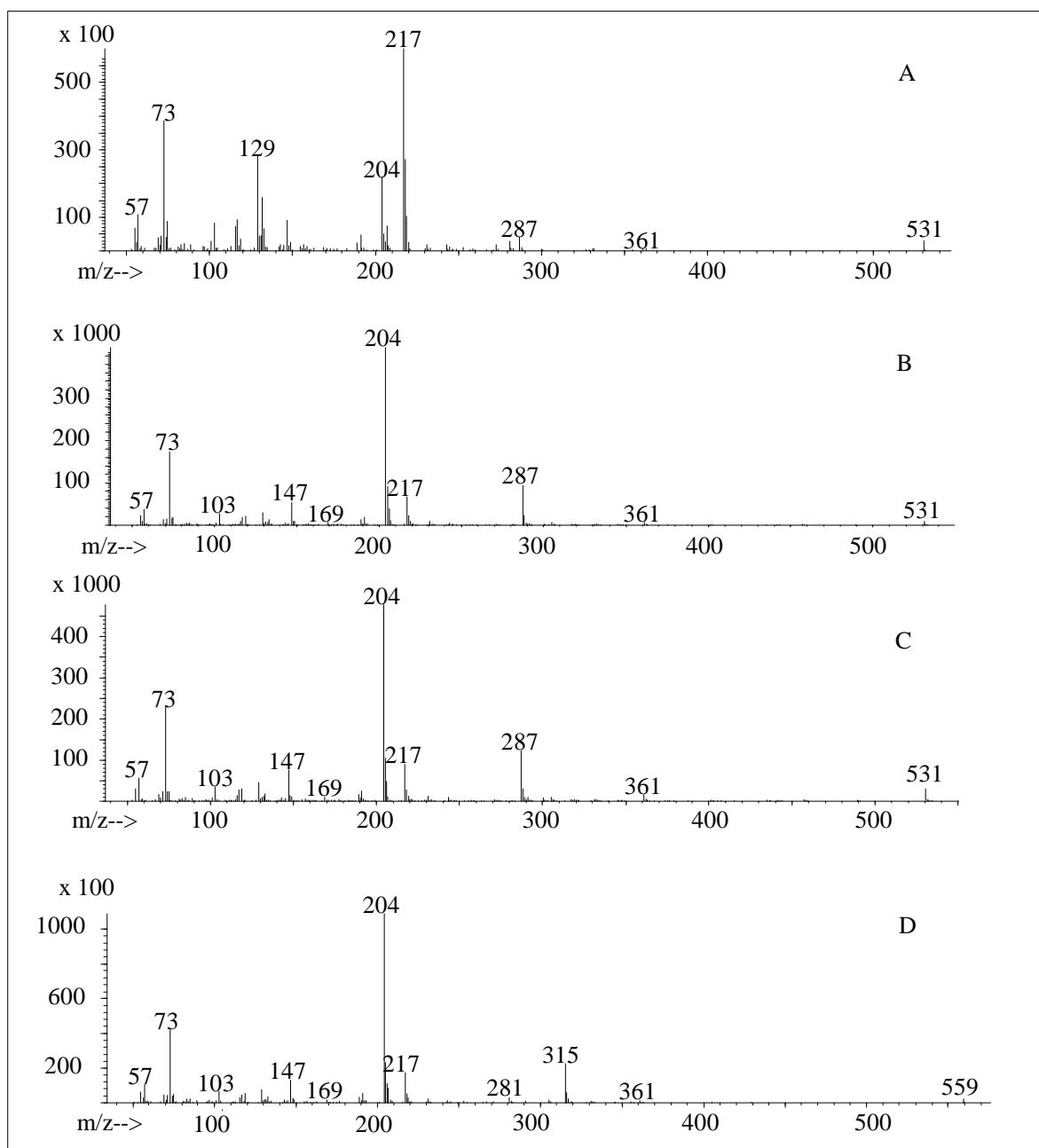


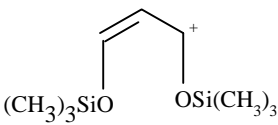
Abbildung 5-21: EI-Massenspektren (70 eV) ausgewählter APG-TMS-Derivate

A: Dodecyl- β -D-Monoglucufuranosid, B: Dodecyl- α -D-Monoglucopyranosid.
C: Dodecyl- β -D-Monoglucopyranosid, D: Tetradecyl- β -D-Monoglucopyranosid.

Neben den bereits erwähnten Fragmenten enthalten die EI-Spektren weitere charakteristische Ionen mit Intensitäten von über 20 %. Das Ion $m/z = 73$ ist typisch für eine prächromatographische Silylierung, während $m/z = 147$ besonders charakteristisch für silylierte Kohlenhydrate ist.

Das Molekülion konnte in keinem der EI-Spektren gefunden werden. Offenbar wird der Methylsilylrest ($m/z = 73$) sehr leicht abgespalten. Die wichtigsten Fragmente der EI-Spektren von APG-TMS-Derivaten sind in Tabelle 5-5 aufgelistet.

Tabelle 5-5: Fragmentierung von APG-TMS-Derivaten

Fragment	m/z	
$\text{Si}^+(\text{CH}_3)$	73	TMS-Derivate
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}^+\text{HOSi}(\text{CH}_3)_3$	147	TMS-Derivate von Kohlenhydraten
$(\text{CH}_3)_3\text{SiOSi}^+(\text{CH}_3)_3$	147	TMS-Derivate
$\begin{array}{c} \text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3 \\ \\ ^+\text{CHOSi}(\text{CH}_3) \end{array}$	204	Basepeak der Furanoside
	217	Basepeak der Pyranoside
$\text{ROC}^+\text{HOSi}(\text{CH}_3)$..., 287, 315	$\text{R} = \text{CH}_3\text{-(CH}_2)_n$ mit $n = \dots, 12, 14$
$\text{M-}[\text{RO}]\text{-}[(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}]$	361	Furanoside, Pyranoside
$\text{M-}[\text{CH}_3]\text{-}[(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}]$..., 531, 559	[M-105], Alkylrest

In den EI-Massenspektren silylierter Alkyldiglucoside konnten die gleichen Ionen wie in den EI-Spektren der monoglucosidischen Komponenten detektiert werden. Der einzig wahrnehmbare Unterschied war die höhere Intensität des Fragments $m/z = 73$. Dies läßt sich dadurch erklären, weil statt vier sieben Trimethylsilylreste an Alkyldiglucoside gebunden sind und eine Abspaltung dieses Fragmentes demzufolge noch häufiger auftritt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, daß die von De Jongh et al. [1969] publizierten Fragmentierungswege für silylierte Kohlenhydrate durchaus auch auf APG anwendbar sind.

Alle weiteren Untersuchungen, insbesondere die Quantifizierung, wurden auf die Analyse von Alkylmonoglucosiden beschränkt. Vorversuche mit silylierten Referenzsubstanzen haben ergeben, daß Alkyldiglucoside in der GC diskriminiert werden. Ihre Flüchtigkeit ist trotz Silylierung für eine gaschromatographische Analyse völlig unzureichend.

5.6.3 Quantifizierung von Alkylmonoglucopyranosiden mittels GC-MS

Die Quantifizierung der Alkylmonoglucoside mittels GC-MS erfolgte über einen internen Standard. Zur Ermittlung der Responsefaktoren wurden die Referenzsubstanzen in Gegenwart von C7G1 silyliert und mittels GC-MS analysiert. Zur Auswertung wurde aus den Totalionenchromatogrammen die Ionenspur 204, die den Basepeak aller TMS-Derivate von pyranosiden Alkylmonoglucosiden darstellt, extrahiert. Aus den Peakflächen und den

Einwaagen wurden die Responsefaktoren errechnet. Wie Abbildung 5-22 verdeutlicht, steigt der Responsefaktor mit zunehmender Länge des Alkylrestes an, d.h. die Empfindlichkeit der MS-Detektion von APG-TMS-Derivaten sinkt mit der Zunahme der Länge des Alkylrestes.

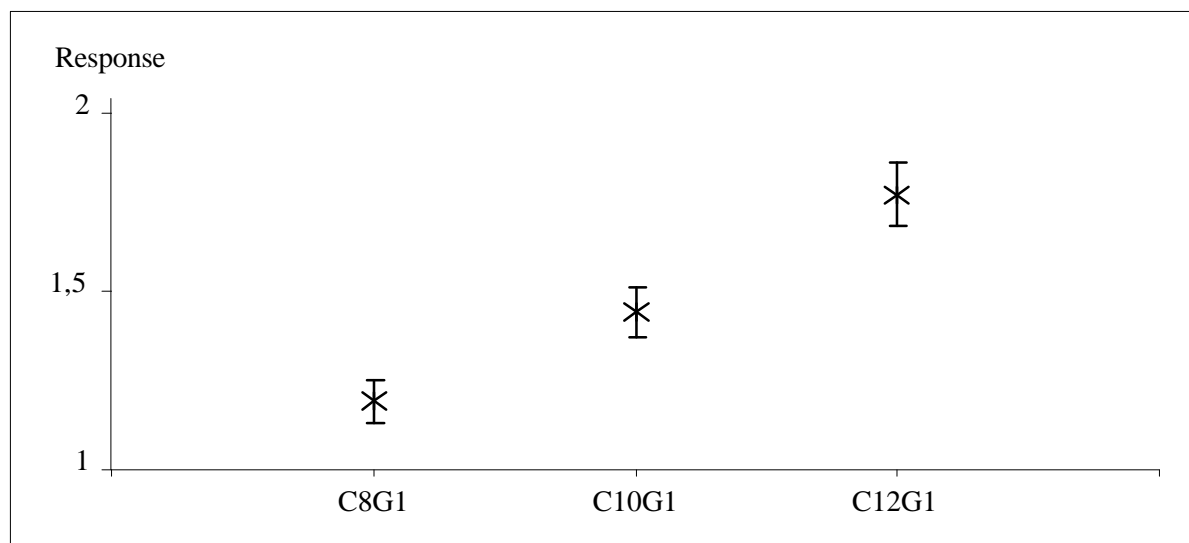


Abbildung 5-22: Responsefaktoren ausgewählter APG gegenüber dem ISTD C7G1

C7G1 (ISTD), C8G1, C10G1, C12G1: n-Alkyl- β -D-Monoglucopyranoside.
Dargestellt sind die Mittelwerte ($n = 3$) und eine Standardabweichung von 5 %.

C10- α -G1 und C10- β -G1 besitzen nahezu identische Responsefaktoren, weshalb anomere Komponenten über den gleichen Faktor bestimmt werden konnten. Zur Quantifizierung der C14-Verbindungen wurde aus Mangel an geeignetem Referenzmaterial der Responsefaktor von C12G1 eingesetzt.

Zur Bestimmung des Gehaltes von Alkylmonoglucopyranosiden in technischen APG-Gemische wurden die getrockneten Proben vor der Silylierung mit dem ISTD versetzt. Der Rückstand wurde silyliert und mittels GC-MS analysiert. Mit Ausnahme von Glucopon 225, dessen Anteil an Monoglucopyranosiden geringer ist, konnte bei den übrigen Gemischen über 40 % der eingewogenen Trockensubstanz erfasst werden (Abbildung 5-23). Die Gemische Plantacare 1200 UP und Glucosid 24, die ausschließlich langkettige Alkylreste beinhalten, weisen einen etwas geringeren Anteil an Monoglucosiden auf als Plantacare 818 UP und Plantacare 2000 UP. Die Ursache liegt sehr wahrscheinlich im Fehler der Quantifizierung des C14-Monoglucosids, da der zur Berechnung eingesetzte Responsefaktor kleiner als der tatsächliche Wert ist.

Wie von Spilker et al. [1996] beschrieben, liegen die anomeren Formen der Alkylmonoglucopyranoside im Verhältnis von 2:1 vor.

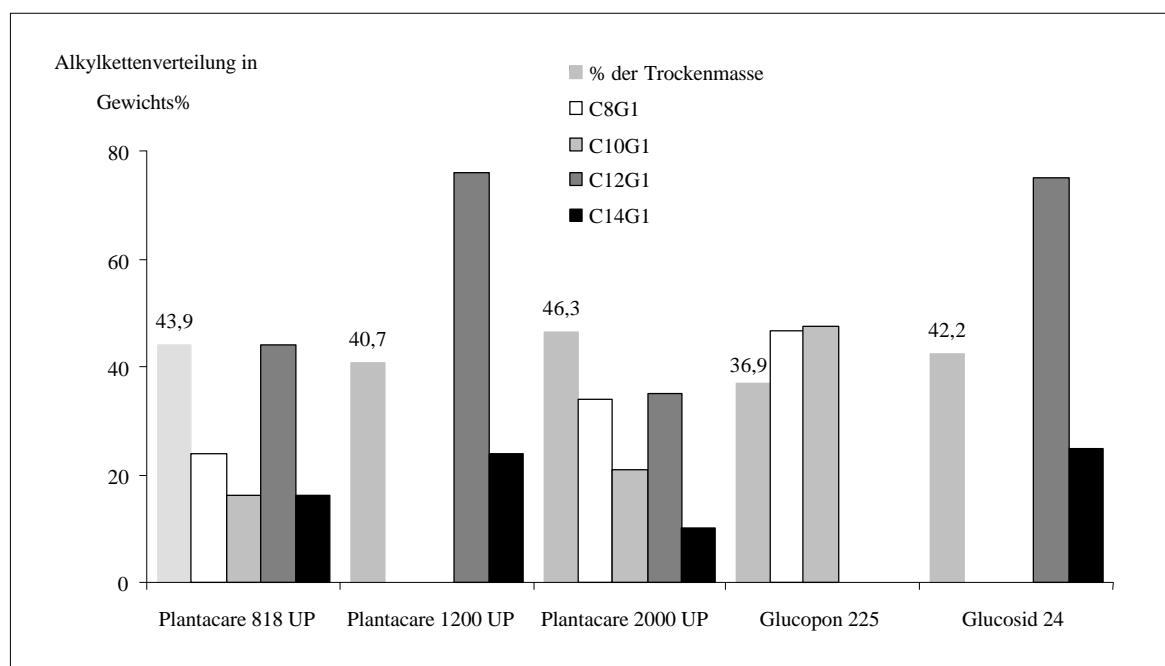


Abbildung 5-23: Bestimmung von Alkylmonoglucopyranosiden in technischen APG-Gemischen mittels GC-MS

Neben dem Gewichtsanteil der Alkylmonoglucopyranoside an der Trockenmasse (jeweils 1. Balken v.l., beschriftet) wurde das Alkylkettenspektrum der Gemische analysiert (Balken 2-5 entsprechen in der Reihenfolge den Alkylresten C8-C14).

Zur Abschätzung der Empfindlichkeit der GC-MS-Methode wurden Standardlösungen von Alkylmonoglucosiden (C8-C12) und Alkyldiglucosiden (C8-C14) silyliert. Es wurden 4 Konzentrationsstufen verwendet, so daß die injizierte Menge für die Alkylmonoglucoside 0,25; 0,5; 2,5 und 5 ng bzw. für die Alkyldiglucoside 10, 25, 50 bzw. 100 ng betrug. Zur Ermittlung der Nachweisgrenze (NG) wurden die TIC-Chromatogramme verwendet, in denen noch ein aussagekräftiges Massenspektrum erhalten wurde. Für die zur Quantifizierung verwendete Ionenspur $m/z = 204$ wurde das Signal/Rausch-Verhältnis bestimmt. In der GC gilt als Nachweisgrenze die Menge an Analyt, bei der das Signal (Peakhöhe) das Rauschen des Detektors um das Dreifache übertrifft [Hübschmann, 1996]. Die so ermittelten Nachweisgrenzen liegen für die monoglucosidischen Verbindungen bei 0,5 ng, während Diglucoside erst ab 25 ng nachweisbar sind. In Verbindung mit der Bestimmung der Tenside aus wäßriger Matrix ergeben sich nach Anreicherung der Analyten aus 10 ml Probe mittels GF Nachweisgrenzen von 0,1 mg/l für Alkylmonoglucoside bzw. 5 mg/l für Alkyldiglucoside.

Diese NG können durchaus noch verbessert werden. Die Empfindlichkeit der MS-Detektion läßt sich mit dem Selected Ion Monitoring (SIM)-Modus steigern, andererseits werden mit der Festphasenextraktion höhere Anreicherungs faktoren als mit der GF erreicht.

Das Hauptproblem der GC-MS-Methode, die Beschränkung der Bestimmung auf die Alkylmonoglucoside kann damit jedoch nicht gelöst werden.

5.7 Analyse von APG mittels GC-FID

Trotz des Verlustes an Information zum Glucosidierungsgrad bietet die Bestimmung von APG nach saurer Hydrolyse mittels GC-FID Vorteile. Durch die Reduktion auf die Fettalkohole entstehen "einfache" GC-Chromatogramme. Unter optimalen Bedingungen werden etwa 90 % der Trockenmasse technischer APG-Gemische erfasst. Allerdings muß beachtet werden, daß die Bestimmung von APG nach saurer Hydrolyse bei matrixreichen Proben zusätzliche Arbeitsschritte erforderlich macht.

5.7.1 Chemische Hydrolyse von APG

APG hydrolysieren unter dem Einfluß konzentrierter Salzsäure [Meissner, 1997]. Die resultierenden Fettalkohole sind mittels GC-FID leicht zu analysieren. In Vorversuchen wurden die Reaktionsparameter der HCl-Spaltung mit dem Ziel einer möglichst vollständigen Hydrolyse der APG optimiert. Gemische aus Alkylmonoglucosiden (C8-C12) und Alkyldiglucosiden (C8-C12) wurden mit jeweils 6 ml HCl ($c = 0,1\text{--}4\text{ mol/l}$) versetzt und 90 min bei 103°C hydrolysiert. Der Vergleich der Peakflächen der Fettalkohole ergab, daß ab einer HCl-Konzentration von 1 mol/l der hydrolytische Prozess nahezu vollständig verläuft, die WF lagen im Mittel bei 94 %. Unter den genannten Reaktionsbedingungen (vgl. auch Kap. 4.6.2) werden monoglucosidische Komponenten in stärkerem Maße hydrolysiert als diglucosidische Verbindungen. Während C10G1 im Mittel von drei Analysen mit 96 % als Decanol wiedergefunden wurde, betrug die WF von C10G2 nur 88 %. Die relativen Standardabweichungen lagen jeweils unter 3 %.

Die Hydrolysedauer hat nur unwesentlichen Einfluß auf die WF. So verringert sich die WF bei weniger als 60 min Hydrolysezeit auf etwa 75 %. Eine Ausdehnung auf mehr als 90 min wurde nicht weiterverfolgt, da es das Ziel war, die Proben im Rahmen einer routineanalytischen Methode innerhalb eines Tages für die GC-Analyse vorbereiten zu können.

Einen entscheidenden Einfluß auf die WF hatte der pH-Wert der Lösung unmittelbar vor der LLE der Fettalkohole mit Ethylacetat. Abbildung 5-24 zeigt, daß bei $\text{pH} = 7$ hohe WF für alle Alkylketten erreicht werden. Bleibt die Lösung dagegen sauer, so sinkt die WF der C14-Komponenten als Tetradecanol bis unter 10 %. In den GC-FID-Chromatogrammen wurde

eine extreme Peakverbreiterung sichtbar, eine eindeutige Unterscheidung des Tetradecanol-Peaks vom Untergrund war unter diesen Bedingungen unmöglich.

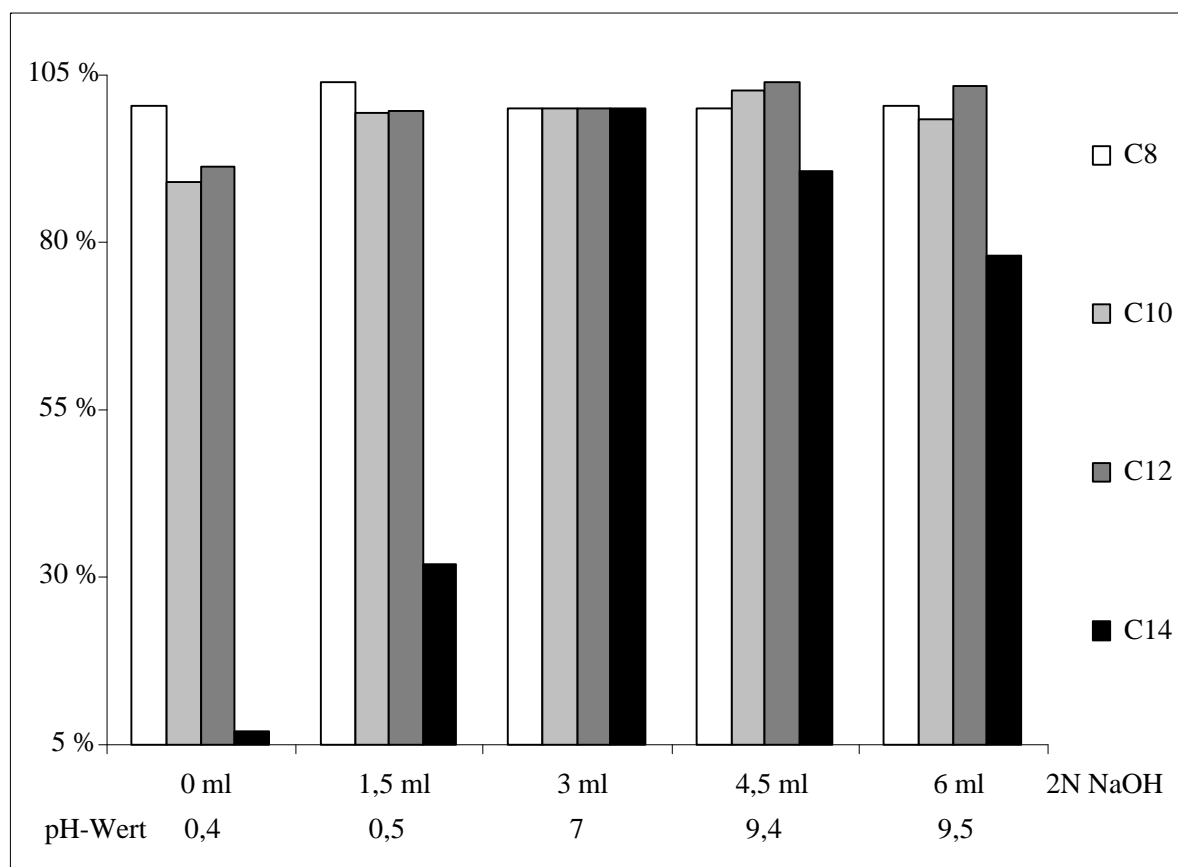


Abbildung 5-24: Einfluß des pH-Wertes auf die LLE von Fettalkoholen mit EtOAc

Plantacare 818 UP wurde mit 6 ml 2N HCl hydrolysiert. Nach Zugabe von 2N NaOH wurden die mittels FID detektierten Peakflächen der resultierenden Fettalkohole miteinander verglichen, dabei wurde auf die Peakflächen bei pH = 7 normiert.

Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu prüfen, wurde die Trockenmasse von Plantacare 818 UP in fünf parallelen Ansätzen hydrolysiert. Nach der Neutralisation mit NaOH und dem Ausschütteln der Fettalkohole mit Ethylacetat wurde die Probe mittels GC-FID analysiert. Die WF der einzelnen Alkylketten lagen im Mittel zwischen 83 und 87 %. Die geringere WF verglichen mit der Spaltung von Referenzmaterial hat seine Ursache im Vorhandensein höher glucosidierter Komponenten, deren Spaltung mit zunehmendem Glucosidierungsgrad immer unvollständiger verläuft. Die relativen Standardabweichungen waren mit 4-12 % aber so unbefriedigend, daß der Versuch wiederholt wurde, diesmal jedoch unter Verwendung des ISTD n-Nonanol, der vor der LLE mit dem Extraktionsmittel EtOAc zugegeben wurde. Unter Einbeziehung des ISTD sinkt die relative Standardabweichung bei gleichbleibend guter WF auf Werte zwischen 1,7 % (C8) und 3,9 % (C14).

5.7.2 Quantifizierung von APG mittels GC-FID

Im Ergebnis der HCl-Spaltung werden die glucosidisch gebundenen Fettalkohole freigesetzt. Durch die Hydrolyse von APG mit konzentrierter Salzsäure reduziert sich die Zahl der Peaks in den Chromatogrammen und die Übersichtlichkeit der Chromatogramme steigt. In Abbildung 5-25 ist das GC-FID-Chromatogramm von Plantacare 818 UP nach saurer Hydrolyse dargestellt. Verglichen mit der Bestimmung von APG mittels GC-MS, bei der 15 Peaks innerhalb von etwa 16 min detektiert werden, reduziert sich diese Zahl auf fünf inklusive n-Nonanol. Unter den in Kap. 4.6.2 angegebenen Trennbedingungen werden Retentionszeiten zwischen 1,8 und 5,8 min registriert.

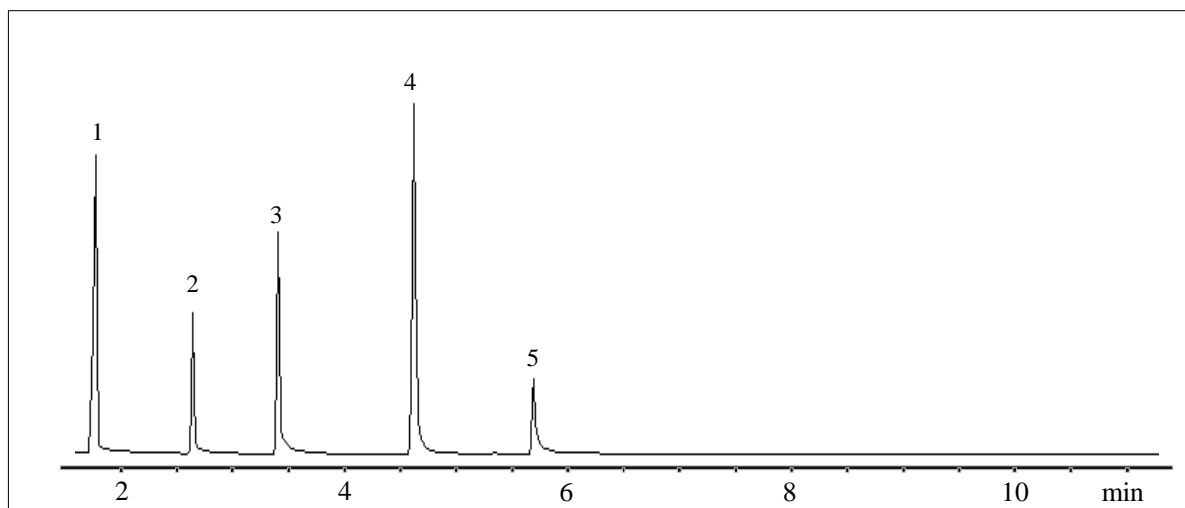


Abbildung 5-25: GC-FID-Bestimmung von Plantacare 818 UP nach Hydrolyse

1 = Octanol; 2 = n-Nonanol (ISTD); 3 = Decanol; 4 = Dodecanol; 5 = Tetradecanol.

Unter Einbeziehung der mittels GC-MS ermittelten Alkylkettenverteilung und des bekannten (Plantacare 1200 UP, Glucopon 225) bzw. des abgeschätzten Polymerisationsgrades von 1,5 (Plantacare 818 UP, Plantacare 2000 UP und Glucosid 24) wurde die eingewogene Trockenmasse der technischen APG-Gemische in einen theoretischen Fettalkoholgehalt umgerechnet und mit dem ermittelten Wert in Relation gesetzt.

Die Bestimmung des Fettalkoholgehaltes nach Hydrolyse der APG erfolgte über eine externe Kalibrierung. In einer Doppelbestimmung wurden Standardlösungen der vier Fettalkohole C8, C10, C12 und C14 bei sechs verschiedenen Konzentrationen im Arbeitsbereich von 6-80 µg/ml analysiert. Aus den Mittelwerten der Peakflächen wurden die Kalibriergeraden erstellt. Für die untersuchten Analyten war das Signal über den gesamten Arbeitsbereich linear mit Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,999$. Für die Routineanalytik

erwies es sich als positiv, daß die Kalibriergeraden über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten stabil blieben, so daß die Zahl der pro Sequenz erforderlichen Kalibrierstandards bei Bedarf reduziert werden konnte.

In Tabelle 5-6 sind die Ergebnisse der GC-FID-Analyse der Trockensubstanz technischer APG-Gemische zusammengefaßt. 5-10 mg getrocknete Probe wurden in 20 ml-Vials eingewogen und nach Zugabe von 6 ml 2N HCl 90 min bei 103°C hydrolysiert. Die WF der einzelnen Alkylketten lagen im Mittel von drei Bestimmungen zwischen 78 und 87 %, bei relativen Standardabweichungen, die für alle Proben und alle Alkylketten kleiner als 6 % waren. Allgemein weisen kurzkettige APG etwas höhere WF als langkettige Verbindungen auf, wie der Vergleich der WF von Plantacare 1200 UP und Glucopon 225 zeigt.

Insgesamt müssen die erzielten WF aber kritisch betrachtet werden, da der oftmals nur abgeschätzte Polymerisationsgrad einen erheblichen Einfluß auf die theoretisch freisetzbare Menge an Fettalkohol hat, der genaue Wert jedoch nur für Plantacare 1200 UP und Glucopon 225 aus der Literatur bekannt war [Hill et al., 1997]. So sinkt die WF von Plantacare 2000 UP unter 75 %, wenn statt 1,5 ein mittlerer theoretischer Polymerisationsgrad von 1,4 in die Berechnung der theoretisch freisetzbaren Menge einfließt.

Tabelle 5-6: WF [%] technischer APG-Gemische nach HCl-Spaltung (n=3)

Gemisch	dp	Alkylkettenspektrum (C8-C10-C12-C14)	C8	C10	C12	C14
Plantacare 818 UP	1,5*	26-15-44-15	86,2 ± 1,2	83,6 ± 1,4	86,3 ± 1,5	85,3 ± 3,7
Plantacare 1200 UP	1,4**	0-0-75-25			81,2 ± 2,2	81,6 ± 4,2
Plantacare 2000 UP	1,5*	34-22-34-10	82,2 ± 1,2	78,1 ± 2,2	79,5 ± 2,7	83,4 ± 4,5
Glucosid 24	1,5*	0-0-75-25			78,0 ± 2,5	80,7 ± 3,8
Glucopon 225	1,7**	49-51-0-0	86,1 ± 1,9	87,0 ± 1,8		

Das Alkylkettenspektrum ergibt sich aus dem prozentualen Anteil jeder Alkylkette am Gesamtgehalt an APG.

* dp abgeschätzt. ** dp nach Hill et al. [1997].

Die Steigerung der WF hängt in besonderem Maße von der Hydrolyse höher glucosidierter Komponenten ab. Da aber die Reproduzierbarkeit der HCl-Spaltung sehr zufriedenstellend war, wurden keine zusätzlichen Optimierungsversuche unternommen. Der Fehler in der Quantifizierung von technischen APG-Gemischen mittels GC-FID kann durch einen Korrekturfaktor, in den die maximale Hydrolyserate und der "Verlust" bei der SPE einfließt, ohne Probleme ausgeglichen werden.

Die Bestimmung von APG nach Hydrolyse ermöglicht eine einfache Analyse des Alkylkettenspektrums von APG-Gemischen. Die Leistungsfähigkeit der entwickelten GC-FID-Methode wird in Abbildung 5-26 demonstriert.

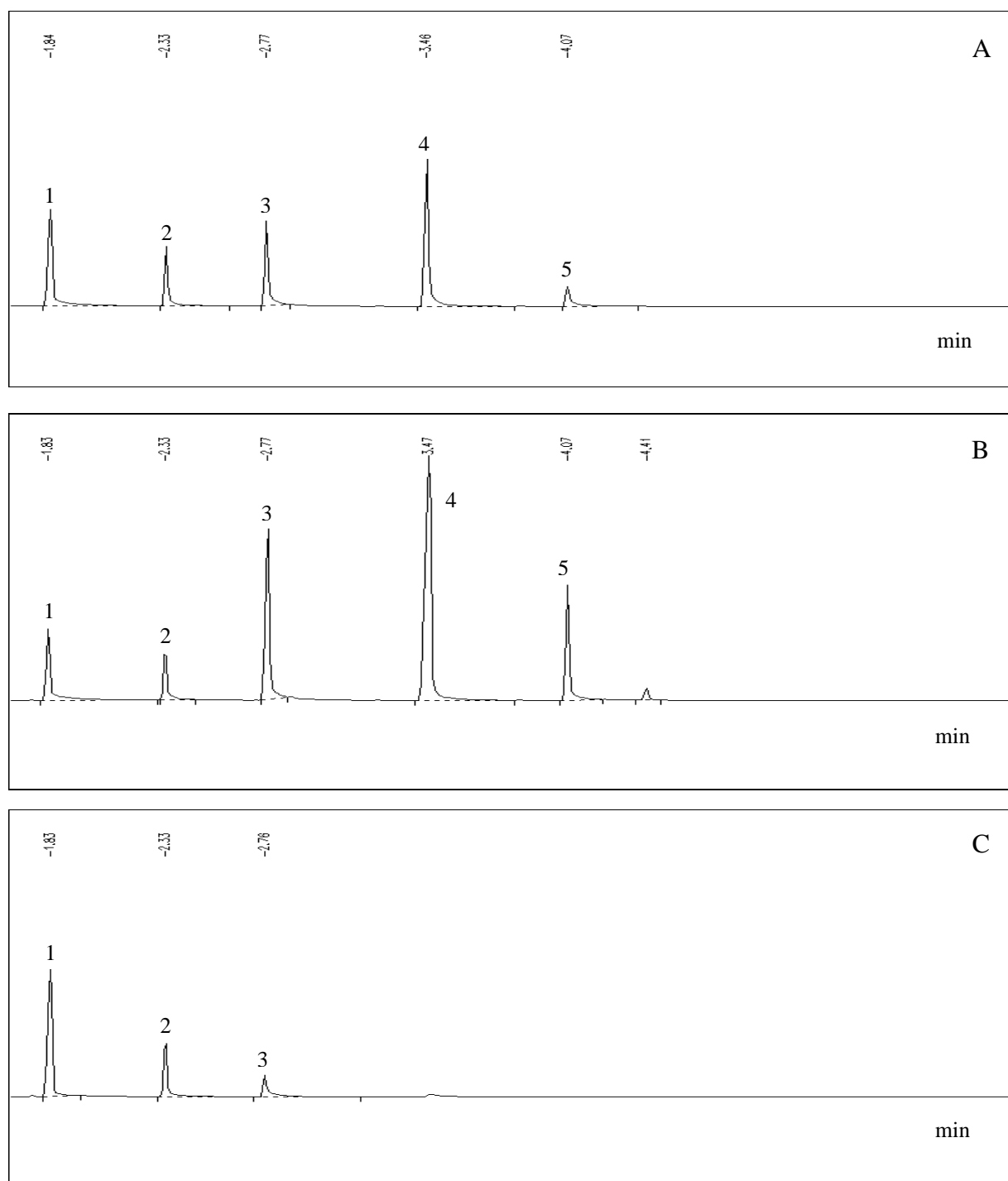


Abbildung 5-26: Veränderung der Zusammensetzung technischer APG-Gemische durch die Anreicherung mittels Schaumfraktionierung

Probe: Plantacare 2000 UP. Peaks wie Abbildung 5-20.

A: Zulauf (0,6 g/l); B: Konzentrat (3,5g/l); C: Klarlauf (0,2 g/l).

Im Teil A der Abbildung 5-26 ist das GC-FID-Chromatogramm des Zulaufs von Proben der Schaumfraktionierung (SF) dargestellt. Die detektierten Fettalkohole spiegeln das Alkylkettenspektrum des Gemisches Plantacare 2000 UP sehr genau wider. Im Bild darunter (B) ist die Zusammensetzung des erzielten Konzentrates dargestellt. Eine Verschiebung der Verteilung hin zu länger-kettigen Verbindungen ist deutlich erkennbar, während der Klarlauf der SF (Bild C) ausschließlich kürzer-kettige APG enthält. Eine direkte Wiederverwendung des Konzentrates scheint nicht möglich, da eine Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften wahrscheinlich ist.

Die quantitative Bestimmung des Gesamtgehaltes an APG erfolgte nach Anreicherung der Proben an ENV+. Je nach APG-Gehalt wurden 10-25 ml Probe extrahiert. Ausgehend von einer Zulaufkonzentration von 0,6 g/l Plantacare 2000 UP wurden im Konzentrat 3,5 g/l und im Klarlauf 0,2 g/l an APG gefunden.

Die Bestimmungsgrenzen der GC-FID-Methode wurden anhand der Konzentrationen, bei denen die Peakflächen noch gut bestimmbar waren, abgeschätzt. Für die verschiedenen Fettalkohole C8-C14 ergaben sich bei der Analyse von Standardlösungen Bestimmungsgrenzen im Bereich von etwa 1 µg/ml. Weitergehende Versuche zur Ermittlung der Nachweisgrenzen wurden nicht durchgeführt, da die mit diesem Verfahren im Routinebetrieb untersuchten Proben zumeist wesentlich höhere Konzentrationen an APG enthielten. In der Regel mußten die ausgeschüttelten Fettalkohole sogar mit Ethylacetat verdünnt werden, um den linearen Arbeitsbereich des FID nicht zu überschreiten.

5.8 Flüssigchromatographische Analyse von APG

Die HPLC bietet die Möglichkeit, APG ohne Veränderung der Moleküle zu analysieren, vorausgesetzt, sie wird mit geeigneten Detektorsystemen gekoppelt. Die eindeutige Identifizierung getrennter Analyten ist eine der Grundlagen erfolgreicher HPLC-Methoden.

Der in der analytischen Chemie weit verbreitete UV-VIS-Detektor ist aufgrund fehlender chromophorer Gruppen ungeeignet zur Visualisierung der HPLC-Trennung von APG-Molekülen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, HPLC-Methoden in Kombination mit sensitiven und selektiven Detektionsverfahren zur Analyse von APG zu entwickeln und im Routinebetrieb zu etablieren.

5.8.1 Einsatz universeller Detektoren in der HPLC-Analyse von APG

Klaffke et al. [1998] haben die flüssigchromatographische Trennung von APG mit einem UV-Detektor bei der Wellenlänge 190 nm detektiert. Die von ihnen angegebene Nachweisgrenze für die Analyse von Modellsubstanzen von 100 mg/kg scheint für die Analyse der Tenside in technischen und kosmetischen Erzeugnissen keinesfalls ausreichend. Bei der Bestimmung eines APG-Gemisches mit vier Alkylkettenlängen resultiert daraus eine Bestimmungsgrenze, die zwischen 1 und 5 g/kg Probe liegen dürfte.

In der HPLC-Analytik haben sich in der Vergangenheit andere Detektoren zur Bestimmung von UV-inaktiven Stoffen wie Lipiden, Kohlenhydraten oder nichtionischen Tensiden bewährt. Insbesondere das Differentialrefraktometer (RI-Detektor), welches eine Änderung des Brechungsindex im Eluenten registriert, scheint für die Detektion derartiger Stoffgemische geeignet. In Abbildung 5-27 ist das RP-HPLC-Chromatogramm von Glucosid 24, abgebildet. Erwartungsgemäß werden APG bei der verwendeten RP-C8-Trennsäule und einem CH₃OH/H₂O-Eluent (80+20, v/v) nach der Länge ihres Alkylrestes getrennt. Die isokratische Arbeitsweise hat eine extreme Zunahme der Retentionszeiten mit der Alkylkettenlänge zur Folge. Die Verwendung von Elutionsgradienten zur Optimierung der HPLC-Trennung scheitert bei RI-Detektoren, da die permanente Änderung des Brechungsindex eine Drift der Basislinie hervorruft. Im vorderen Bereich des HPLC-Chromatogramms sind kleinere Peaks erkennbar, bei denen es sich um diglucosidische Dodecyl-Komponenten handelt. Eine eindeutige Identifizierung dieser, wie auch anderer unbekannter Peaks, besonders bei der Analyse matrixreicher Proben, ist nicht möglich, wenn entsprechendes Referenzmaterial fehlt.

Der in den Versuchen verwendete RI-Detektor des Typs 98.00 (Knauer, Berlin, D) war äußerst sensitiv gegen Temperatur- und Druckschwankungen. Equilibrierungszeiten von zum Teil mehr als 24 h waren erforderlich, um stabile Meßbedingungen zu erhalten, weshalb eine routinemäßige Anwendung dieses Detektors kaum möglich ist.

Die Empfindlichkeit der RI-Detektion wurde anhand von noch gut auswertbaren Chromatogrammen analysierter Standardlösungen von Alkylmonoglucosiden und Alkyl-diglucosiden auf etwa 5 µg absolut injizierte Menge je Verbindung abgeschätzt. Weitergehende Versuche mit diesem Detektortyp wurden aufgrund der genannten Schwierigkeiten nicht durchgeführt.

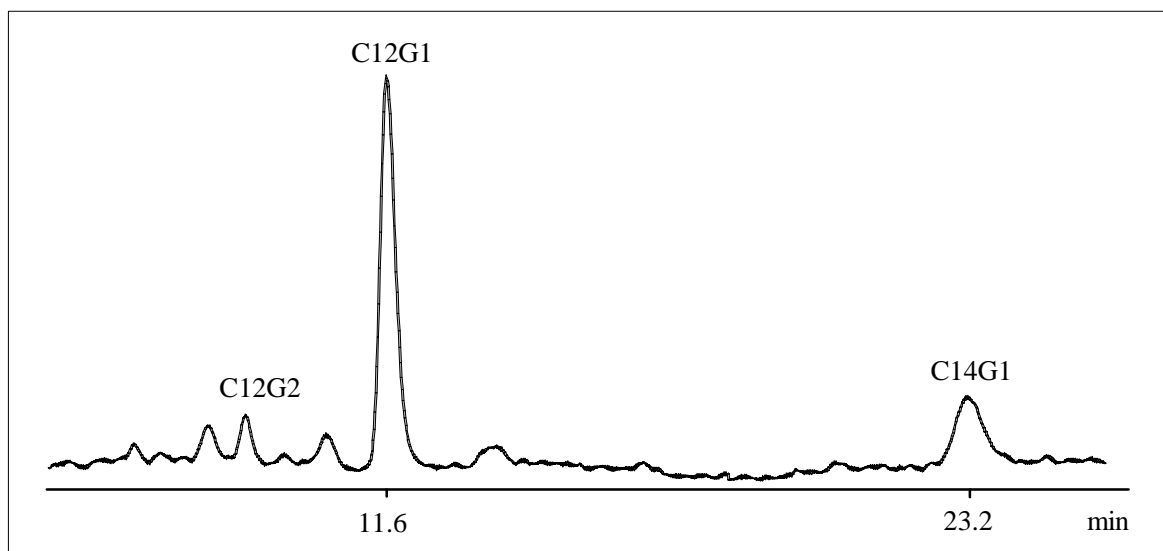


Abbildung 5-27: Analyse von Glucosid 24 mittels RP-HPLC und RI-Detektion

Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm 5 μ m.

Eluent: CH₃OH/H₂O (80+20, v/v). 1,0 ml/min; Probe: 200 μ g Glucosid 24.

Im Vergleich mit dem RI-Detektor hat der für kurze Zeit zugängliche Lichtstreuendetektor 31 (Eurosep Instruments, Cergy-Pontoise, F) einige wesentliche Vorteile. Sein bedeutendstes Plus besteht darin, daß der Detektor durch Laufmittelgradienten nicht in seiner Arbeitsweise gestört wird. Die HPLC-Trennung läßt sich somit an die jeweilige Aufgabenstellung optimal anpassen. Die besten Resultate bei der Detektion einer RP-HPLC-Trennung von APG mit CH₃CN/H₂O als Eluent konnten erzielt werden, wenn der ELSD bei einer Verdampfungstemperatur von 60°C betrieben wurde. Die Multiplierspannung, die wesentlichen Einfluß auf die Signalstärke hat, ließ sich bis zu 500 V ohne Probleme steigern. Höhere Werte sind nicht empfehlenswert, obwohl der ELSD prinzipiell für eine Multiplierspannung von bis zu 750 V ausgelegt ist. Im HPLC-Chromatogramm wurden bei Spannungen oberhalb von 500 V zahlreiche "Störsignale", sehr schmale, aber intensive Peaks registriert, so daß eine quantitative Auswertung unmöglich ist.

Der Response bei der Detektion mit dem ELSD wies erhebliche Unterschiede für die einzelnen APG-Komponenten auf. Er wird maßgeblich von der Größe der Partikel beeinflusst, die nach der Vernebelung des HPLC-Eluates mit Stickstoff und der Verdampfung des Lösungsmittels zurückbleiben. Vergleiche innerhalb der Homologenreihen der monoglucosidischen und diglucosidischen APG haben einen stark abnehmenden Response mit zunehmender Alkylkettenlänge erkennen lassen. Dagegen zeigen Verbindungen unterschiedlichen Glucosidierungsgrades bei gleicher Alkylkettenlänge relativ ähnliche Empfindlichkeiten.

Die doppelt logarithmische Auftragung der Peakflächen gegen die injizierte Menge ergab im Bereich von 2-10 µg lineare Kalibriergeraden mit Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,994$. Die kleinste noch detektierbare Menge, bei der das Signal/Rausch-Verhältnis größer als drei war, betrug für Octyl-Komponenten etwa 250 ng.

Im Routinebetrieb konnte sich der ELSD bei der Analyse von APG nicht durchsetzen. Ähnlich wie beim RI-Detektor bleibt die Bestimmung auf jene Verbindungen beschränkt, die als Referenzmaterial vorhanden sind. Unbekannte Peaks sind ohne weitere spektroskopische Untersuchungen nicht zu identifizieren. Synthetische Abwässer sind mit dem ELSD analysierbar [Wodarczak und Burford, 1998]. Komplexe Proben dagegen erfordern eine umfassende Probenvorbereitung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ELSD zur Detektion der HPLC-Fraktionierung von Glucopon 225 (Kap. 5.9.4.2) eingesetzt. Ziel war dabei die präparative Anreicherung ausgewählter Decyl-Diglucoside mittels HPLC für die spätere Strukturaufklärung mit kernresonanzspektroskopischen Methoden.

5.8.2 HPLC-MS-Bestimmung von APG

Die Massenspektrometrie stellt gegenwärtig die leistungsfähigste Detektionsmethode in der analytischen HPLC dar. Über charakteristische Ionen sind APG einfach und sicher zu identifizieren. Durch die chromatographische Abtrennung der Begleitstoffe von den Analyten werden Matrixeffekte bei der quantitativen Analyse komplexer Gemische weitgehend vermieden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte HPLC-APCI-MS-Methode konnte erfolgreich zur Quantifizierung von APG in technischen und kosmetischen Erzeugnissen (Kap. 5.10.4) eingesetzt werden. Die flüssigchromatographisch getrennten APG wurden im negativen Modus als Quasimolekülonen $[M-H]^-$ detektiert. Die für die Fließinjektionsanalyse optimierten Ionisationsparameter konnten ohne Veränderung übernommen werden.

5.8.2.1 RP-HPLC-MS-Analyse von APG

Aus der Dünnschichtchromatographie war bekannt, daß APG an Umkehrphasen wie RP-C8 oder RP-C18 sowohl nach Alkylrest als auch nach Glucosidierungsgrad getrennt werden. Abbildung 5-28 zeigt das TIC der Chromatographie eines Standardgemisches verschiedener Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) mit einer RP-C8-Trennsäule.

Der für die RP-C8-HPLC entwickelte Acetonitril/Wasser-Gradient A trennt alle Einzelkomponenten des Standardgemisches innerhalb von 15 min. Der organische Anteil des Eluenten wird nach 3 min linear in 7 min von 40 auf 80 % erhöht. Anschließend wird die Chromatographie weitere 5 min isokratisch betrieben. Einschließlich einer Reequilibrierungszeit von 5 min sind somit nur 20 min für eine Analyse erforderlich.

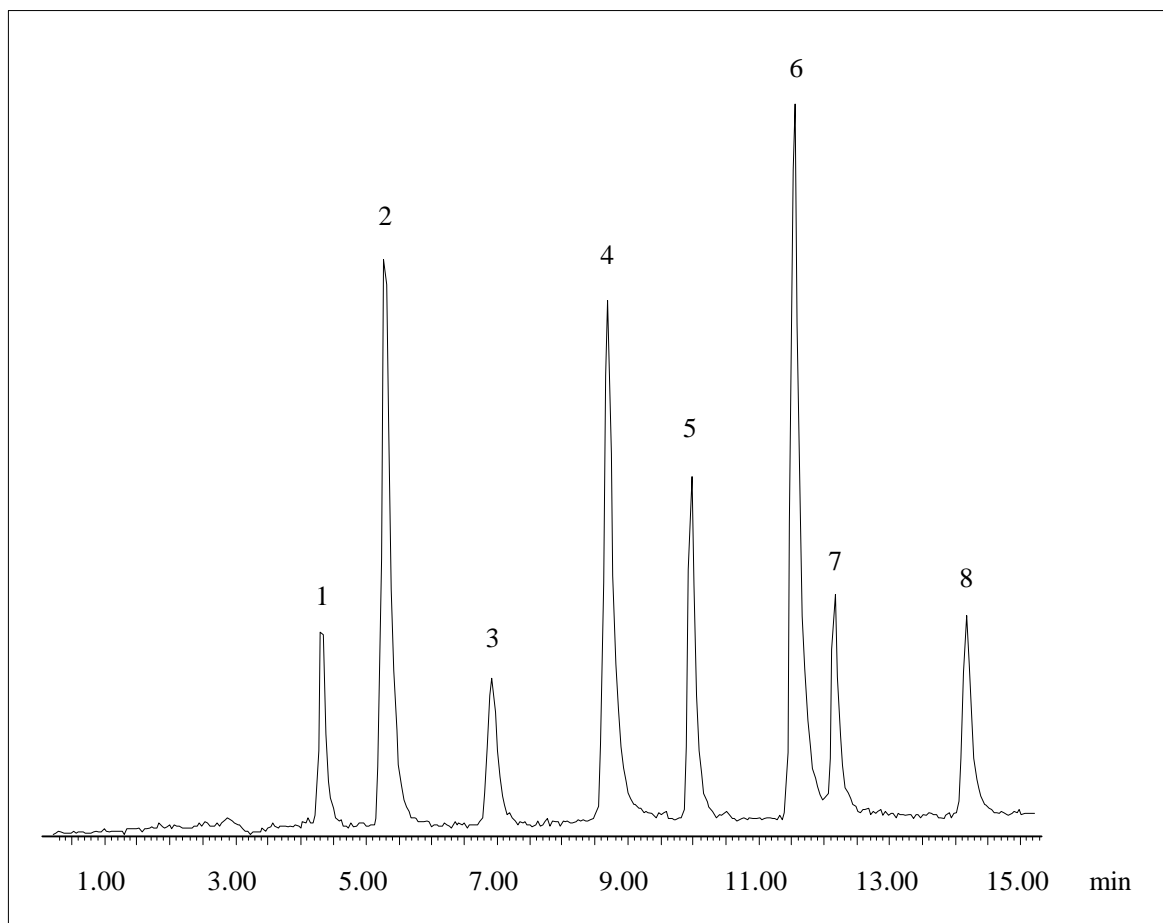


Abbildung 5-28: RP-C8-HPLC-MS-Analyse eines Standardgemisches (20 ng)

Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 μ m. Gradient A. Detektion: APCI- (SIR).

1 = n-Octyl- β -Maltopyranosid (m/z = 453), 2 = n-Octyl- β -Glucopyranosid (291)

3 = n-Decyl- β -Maltopyranosid (481), 4 = n-Decyl- β -Glucopyranosid (319)

5 = n-Dodecyl- β -Maltopyranosid (509), 6 = n-Dodecyl- β -Glucopyranosid (347)

7 = n-Tetradecyl- β -Maltopyranosid (537), 8 = n-Hexadecyl- β -Maltopyranosid (565).

Peaküberlagerungen der injizierten Alkyl- β -Glucopyranoside und Alkyl- β -Maltopyranoside werden im gesamten Chromatogramm nicht beobachtet. Lediglich das Peakpaar 6/7 scheint kritisch. Hier hilft die hohe Selektivität der MS-Detektion. Die Extraktion der entsprechenden Ionen (C12G1: m/z = 347; C14G2: m/z = 537) aus dem TIC führt zu den einzelnen Ionenspurten, in denen jeweils nur ein intensiver Peak registriert wurde. Damit ist eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen möglich.

Alkylmaltopyranoside eluieren unter den genannten Trennbedingungen jeweils vor den entsprechenden monoglucosidischen Komponenten gleicher Alkylkettenlänge. Ihre höhere Polarität infolge einer zusätzlichen Glucoseeinheit hat geringere Wechselwirkungen der Verbindungen mit der RP-C8-Trennphase und damit kürzere Retentionszeiten zur Folge.

In den Ionenspuren der Glucopyranoside ist neben dem Hauptpeak jeweils ein weiterer Peak deutlich geringerer Intensität zu finden, der in seiner Retentionszeit mit dem Maltopyranosid gleicher Alkylkettenlänge übereinstimmt. Dieser Peak entsteht erst in der Ionenquelle durch Abspaltung von Glucose aus der maltosidischen Verbindung.

Das Retentionsverhalten der anomeren Alkylmonoglucopyranoside unterscheidet sich grundlegend von dem der Alkylmaltopyranoside. Während sich die anomeren Verbindungen C10- α -G1 und C10- β -G1 unter den genannten Bedingungen flüssigchromatographisch nicht trennen lassen, zeigen die Anomere des C12G2 unterschiedliche Retentionseigenschaften (Abbildung 5-29).

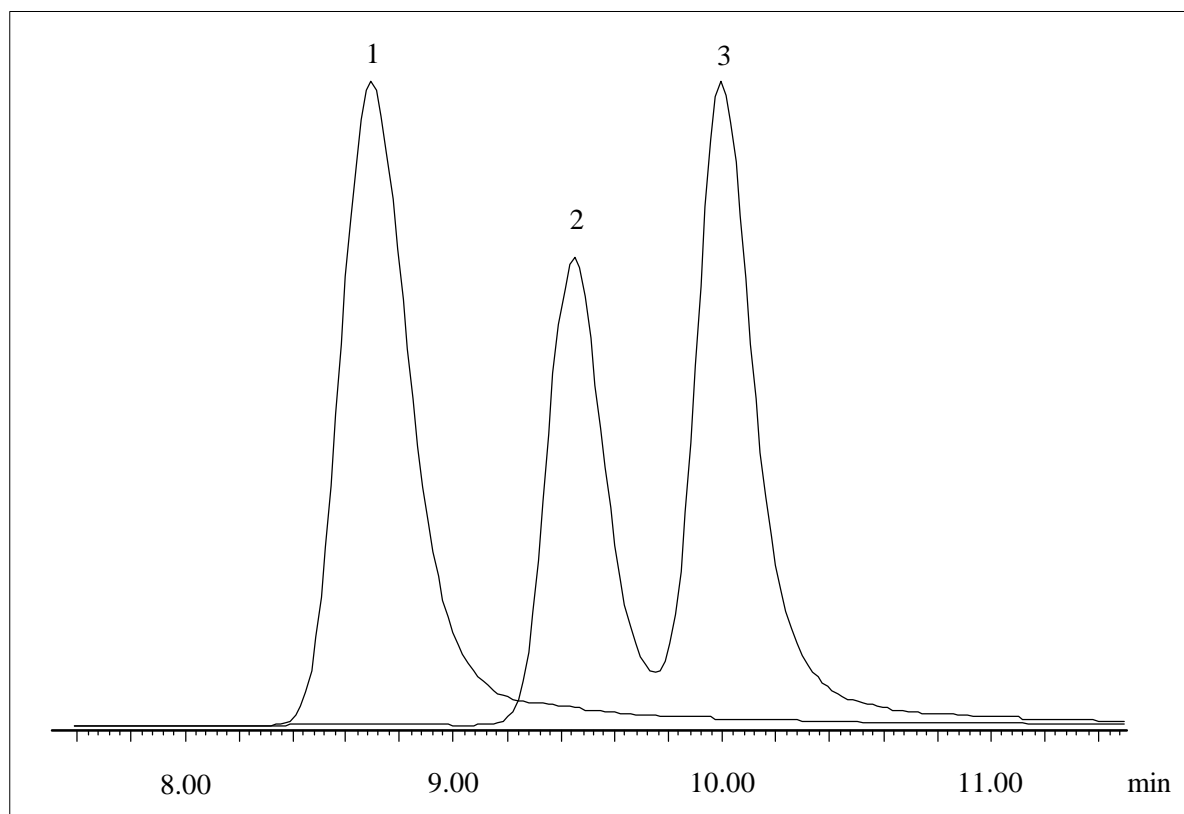


Abbildung 5-29: TIC der RP-HPLC-Trennung anomerer APG (50 ng)

Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4.6 mm, 5 μ m. Gradient A. Detektion: APCI- (SIR).
1 = C10- α -G1/C10- β -G1, 2 = C12- α -G2, 3 = C12- β -G2.

5.8.2.2 Empfindlichkeit und Linearität

Die Detektion bei der RP-C8-HPLC-MS-Analyse erfolgte mit wenigen Ausnahmen im SIR-Modus. Bei hoher Empfindlichkeit konnte die anfallende Datenmenge erheblich reduziert werden. Zur Ermittlung der Detektionsgrenze wurde ein Standardgemisch mit den Alkylmonoglucosiden C8-C12 und den Alkyldiglucosiden C8-C14, gelöst in Acetonitril/Wasser (40+60, v/v) mittels RP-HPLC-MS analysiert. 20 µl einer Standardlösung mit $c = 0,01 \mu\text{g/ml}$ wurden injiziert. In Abbildung 5-30 sind die SIR-Chromatogramme der untersuchten Verbindungen abgebildet.

Die Detektionsgrenze wurde durch lineare Extrapolation auf ein Signal/Rausch-Verhältnis von drei auf 0,1 ng je Analyt abgeschätzt. Es muß aber unbedingt darauf hingewiesen werden, daß die Empfindlichkeit der MS-Detektion großen Schwankungen unterlag. In Abhängigkeit von der Art der Nutzung des HPLC-MS-Systems durch andere Projektpartner kam es mitunter vor, daß die Empfindlichkeit des MS-Systems an einigen Versuchstagen um den Faktor 10 schlechter war. Auch kam es vor, daß der Response von Alkylmonoglucosiden und Alkyldiglucosiden an verschiedenen Meßtagen sehr starke Unterschiede aufwies.

Allgemein waren APG ab 10 ng zuverlässig quantitativ bestimmbar. Voraussetzung dafür ist die Anwendung eines ISTD. Die zu untersuchenden Proben wurden vor der HPLC-MS-Analyse mit dem internen Standard C9G1 versetzt, so daß die Endkonzentration des ISTD in der Probe etwa $10 \mu\text{g/ml}$ betrug. Im Arbeitsbereich von 10-200 ng wurden sowohl für Alkylmonoglucoside als auch für Alkyldiglucoside lineare Kalibriergeraden mit Korrelationskoeffizienten $R^2 > 0,998$ erhalten.

Oberhalb von 500 ng war eine quantitative Bestimmung von APG nicht möglich, da der Zusammenhang zwischen Analytmenge und Peakfläche nicht mehr linear war. Offenbar wurde eine Art von Sättigungsgrenze erreicht.

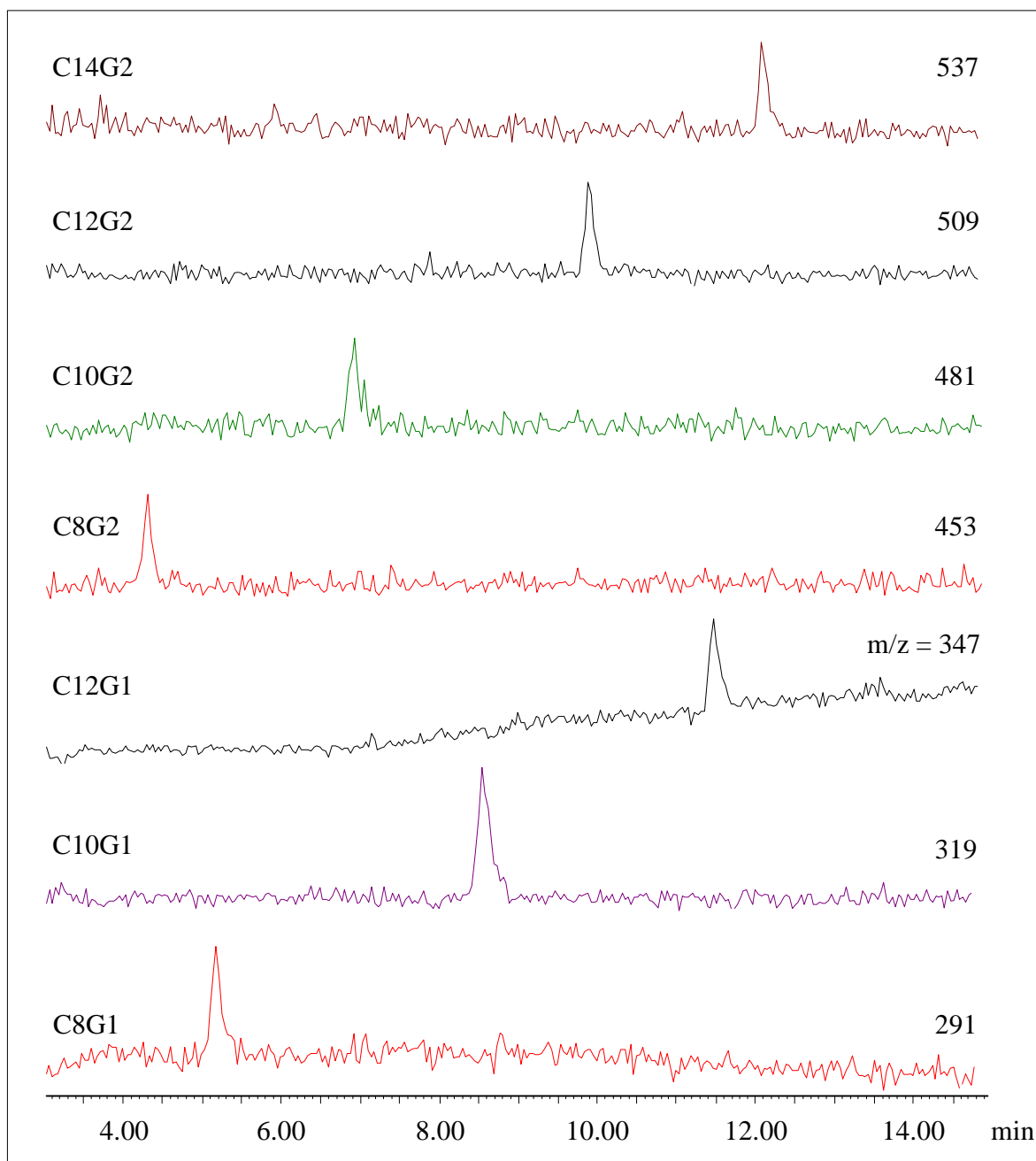


Abbildung 5-30: SIR-Chromatogramme eines Standardgemisches (0,2 ng)

Zur HPLC: siehe Abbildung 5-28. Detektion: APCI- (SIR).
 Injektion: 20 µl einer Standardlösung mit $c = 0,01 \mu\text{g/ml}$.

Stellvertretend für die zur externen Kalibrierung eingesetzten Referenzsubstanzen sind die Kalibriergeraden von C10G1 und C10G2 in Abbildung 5-31 dargestellt. Die Werte der Peakflächen stellen Mittelwerte aus drei Injektionen dar. Es wurden fünf Konzentrationsstufen verwendet, so daß die injizierte Mengen je Substanz 10, 50, 100, 150 und 200 ng betrugen.

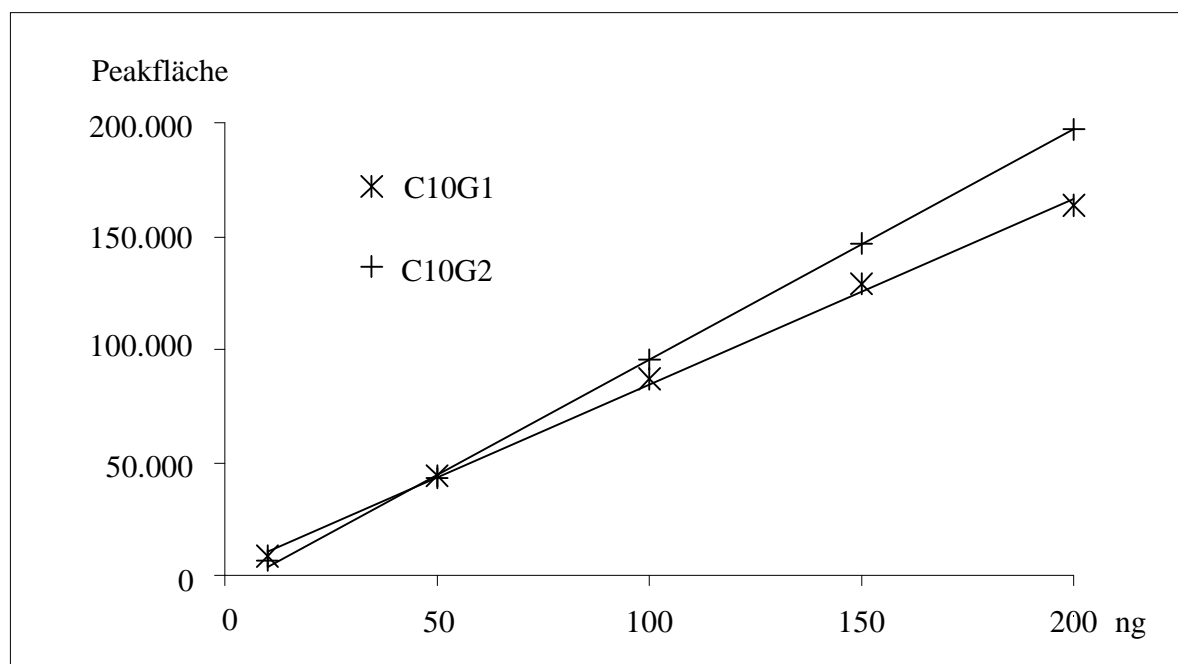


Abbildung 5-31: Kalibrierkurven ausgewählter APG (10-200 ng)

Trennung mittels RP-HPLC. Detektion: APCI- (SIR-Modus).
C10G1 = n-Decyl-Monoglucoosid. C10G2 = n-Decyl-Maltosid.

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde Leitungswasser mit einem Standardgemisch aus Alkylmonoglucoosiden (C8-C12) und Alkyldiglucoosiden (C8-C14) im Konzentrationsbereich von 0,1-4 µg/l dotiert. Nach der Extraktion von 100 ml Probe mit ENV+ erfolgte die Analyse mittels RP-HPLC. Die Analyten wurden im negativen APCI-Modus als Quasimolekülonen $[M-H]^-$ im SIR-Modus detektiert. Die NG wurde durch lineare Extrapolation auf ein Signal/Rausch-Verhältnis von drei in der jeweiligen Ionenspur bestimmt. Die so ermittelten Nachweisgrenzen lagen für alle untersuchten APG im Bereich zwischen 0,2 und 0,5 µg/l. Die Bestimmungsgrenze beträgt für alle Analyten 1 µg/l.

Im allgemeinen zeigen diglucoosidische Verbindungen etwas bessere NG als Alkylmonoglucooside. Die Ursache hierfür ist im geringeren Rauschen des MS-Systems im höheren Massenbereich ($m/z > 400$) zu finden.

5.8.2.3 Quantitative Analyse von technischen APG-Gemischen

In Abbildung 5-32 sind die SIR-Chromatogramme der RP-C8-HPLC-Trennung von Glucopon 225 dargestellt. Erwartungsgemäß findet man in den Ionenspuren der Alkylmonoglucooside jeweils nur einen intensiven Peak, da unter den eingesetzten Analysenbedingungen die Anomere der Alkylmonoglucooside co-eluierten.

Im Unterschied dazu weisen die Ionenspuren der Diglucoside mehrere relativ intensive, aber zumeist nur unvollständig aufgelöste Peaks auf. Der Vergleich mit Referenzmaterial führte lediglich zur Identifizierung der anomeren Alkylmaltoside. Zum Nachweis wurde Plantacare 2000 UP mit C12- α -G2 und C12- β -G2 aufgestockt und mittels HPLC-MS analysiert. Aus der Zunahme der Peakflächen bei zwei der sechs getrennten Peaks wurden die Retentionszeiten der beiden Anomere ermittelt. Da sich das Peakmuster der Dodecyl-Diglucoside von Plantacare 2000 UP nicht vom Peakmuster der Decyl-Diglucoside von Glucopon 225 unterscheidet, konnte auf das Retentionsverhalten der anomeren Decyl-Diglucoside in Glucopon 225 zurückgeschlossen und die entsprechenden Retentionsdaten bestimmt werden.

Weil die als Referenz vorliegenden n-Alkyl-D-Maltopyranoside nur Minorkomponenten unter den Diglucosiden darstellen, wurden in weitergehenden Versuchen einzelne der diglucosidischen Komponenten präparativ angereichert und zwecks Aufklärung ihrer Stereochemie mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) untersucht. Dabei konnte n-Decyl- α (1 \rightarrow) Isomaltosid als eine der Hauptkomponenten identifiziert werden (vgl. Kap. 5.9.4).

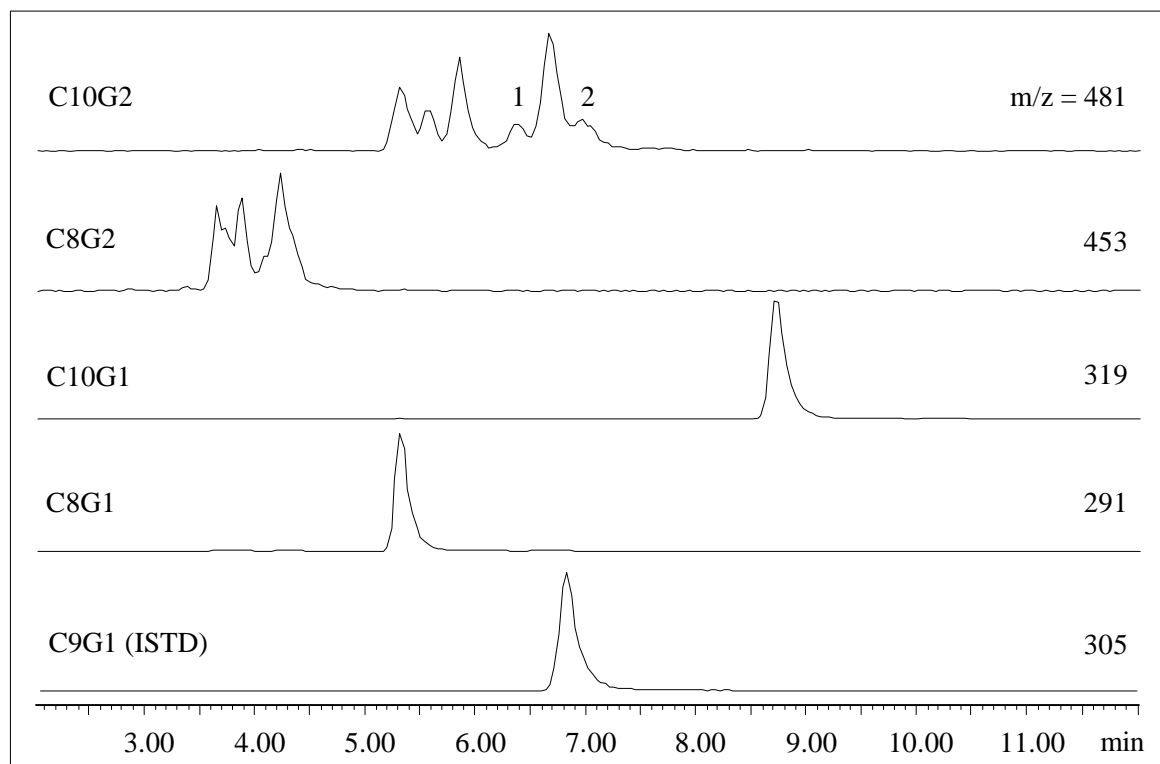


Abbildung 5-32: RP-C8-HPLC-MS-Analyse von Glucopon 225

Zur HPLC: siehe Abbildung 5-28. Det.: APCI- (SIR). Inj.: 20 μ l (c = 50 μ g/ml).
1 = n-Decyl- α -Maltosid, 2 = n-Decyl- β -Maltosid.

Die Bestimmung des APG-Gehaltes mittels RP-C8-HPLC-MS erfolgte über eine externe Kalibrierung. Mangels Referenzmaterial wurde der Gehalt an C14G1 über die Kalibrierung von C12G1 ermittelt.

Da eine vollständige chromatographische Trennung aller isomeren Alkyldiglucoside nicht erreicht werden konnte und zudem mit Ausnahme von C12G2, für das beide Anomere als Referenzmaterial vorhanden waren, mit den n-Alkyl- β -D-Maltopyranosiden nur jeweils ein Stereoisomer zur externen Kalibrierung zur Verfügung stand, wurde bei den Diglucosiden eine besondere Vorgehensweise gewählt. Zur quantitativen Erfassung wurden die Peakflächen aller diglucosidischen Isomere mit gleicher Alkylkettenlänge summiert und der Gehalt über das jeweilige n-Alkyl- β -D-Maltopyranosid bestimmt. Dabei wurde vorausgesetzt, daß die verschiedenen Isomere, die sich hinter den unvollständig getrennten Verbindungen gleichen Molekulargewichtes verbergen, einen zur Referenzsubstanz relativ ähnlichen Response aufweisen. Ein Fehler kann allerdings bei dieser Form der Quantifizierung nicht völlig ausgeschlossen werden. Als Alternative zur Gewinnung von Referenzmaterial käme aber nur die sehr kostenintensive stereoselektive Synthese der einzelnen Isomere oder deren präparative Anreicherung aus technischen Gemischen in Frage. Beides wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse sind in Tabelle 5-7 zusammengefaßt. Im Mittel konnten 58-74 % der Trockenmasse als Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside bestimmt werden. Verglichen mit der quantitativen Bestimmung mittels GC-MS nach Silylierung konnte der bestimmbare Anteil der Trockenmasse von 42 auf 66 % gesteigert werden. Hauptgrund hierfür ist die zusätzliche quantitative Erfassung der Alkyldiglucoside.

Tabelle 5-7: HPLC-MS zur Quantifizierung von APG in technischen Gemischen

Gemisch	Alkylmonoglucoside	Alkyldiglucoside	Summe G1+G2	Verhältnis G1/G2
Plantacare 818 UP	52,7 \pm 2,5 %	13,6 \pm 0,7 %	66,3 %	3,9
Plantacare 1200 UP	59,1 \pm 1,8 %	11,3 \pm 0,5 %	70,4 %	5,2
Plantacare 2000 UP	49,2 \pm 1,5 %	13,7 \pm 0,9 %	62,9 %	3,6
Glucosid 24	63,9 \pm 1,7 %	10,4 \pm 0,6 %	74,3 %	6,1
Glucopon 225	43,1 \pm 1,9 %	15,3 \pm 1,2 %	58,4 %	2,8
Mittelwert	53,6 %	12,8 %	66 %	

Angegeben sind die mittleren Gehalte der Mono- und diglucoside in Gewichts% sowie deren Schwankungsbreiten (n=3). Die Gehalte beziehen sich auf die analysierte Trockenmasse. Der Mittelwert ergibt sich aus der Analyse der fünf technischen APG-Gemische.

Die Trockenmasse von Glucopon 225, dessen Polymerisationsgrad (dp) nach Hill et al. [1997] bei 1,7 liegt, konnte insgesamt nur zu 58 % analysiert werden. Der Anteil höher glucosidierter Verbindungen, die in den Quantifizierungen unberücksichtigt bleiben, ist bei dieser Probe offensichtlich deutlich größer als z.B. im Gemisch Glucosid 24, dessen Trockenmasse immerhin zu 74 % bestimmt werden konnte. Ausgehend von den Literaturwerten für die Polymerisationsgrade von Plantacare 1200 UP (1,4) und Glucopon 225 (1,7) kann aus dem Verhältnis der Gewichtsanteile der Mono- und Diglucoside der Polymerisationsgrad der anderen Gemische näherungsweise abgeschätzt werden. So erhält man für Glucosid 24 den niedrigsten dp aller untersuchten Proben (ca. 1,3), während Plantacare 818 und 2000 UP bei einem dp von etwa 1,5 einzustufen sind.

Die genaue Bestimmung des Polymerisationsgrades setzt die komplette Quantifizierung der Trockensubstanz voraus. Dies konnte bisher noch nicht erreicht werden. Zwar ist es prinzipiell möglich, mittels API-MS auch höher glucosidierte Verbindungen zu erfassen, da das verwendete Massenspektrometer bis in Bereiche oberhalb von $m/z = 2000$ betrieben werden kann. Einige Argumente sprechen letztlich jedoch gegen die quantitative Bestimmung der Oligomere. Abgesehen davon, daß der prozentuale Gewichtsanteil an der Trockenmasse mit der Zahl der Glucoseeinheiten immer kleiner wird, erfolgt außerdem eine immer stärker werdende chromatographische Aufsplitterung in die verschiedenen Isomere. Schließlich wird es unmöglich, die Peakflächen genau zu bestimmen, ohne die injizierte Probenmenge deutlich zu erhöhen. In der Regel führt dies jedoch zu einer Überladung von analytischen HPLC-Säulen. Davon unabhängig ist eine externe Kalibrierung mangels Referenzmaterial bisher nicht möglich. Eine einfache Abschätzung des Responsefaktors für Triglucoside und höhere Oligomere als Bestimmunggrundlage wurde als zu unsicher empfunden. Damit ist es derzeit noch nicht möglich, den Gehalt höher glucosidierter APG zu bestimmen. Dies gilt auch für die Quantifizierung nach Fließinjektionsanalyse, bei der keine chromatographische Trennung isomerer Komponenten stattfindet.

Das Alkylkettenspektrum, welches aus den Gehaltsbestimmungen mittels HPLC-MS resultiert, weist keine signifikanten Unterschiede zu den mittels GC-MS und GC-FID erhaltenen Alkylkettenverteilungen auf. Die drei Methoden führen zu vergleichbaren Resultaten (Abbildung 5-33), obwohl die Datenbasis jeweils eine andere ist. Während sich die Bestimmung mittels GC-MS auf die Alkylmonoglucopyranoside beschränkt, werden mittels HPLC-MS Monoglucoside und Diglucoside erfaßt. Die Analyse des Alkylkettenspektrums mittels GC-FID nach Hydrolyse scheint die besten Ergebnisse zu liefern, immerhin werden

~ 90 % der Trockenmasse erfasst (siehe auch Kap. 5.7). Dabei muß aber beachtet werden, daß oligomere APG aufgrund der etwas geringeren Hydrolysegeschwindigkeit diskriminiert werden und so im Spektrum weniger stark präsent sind.

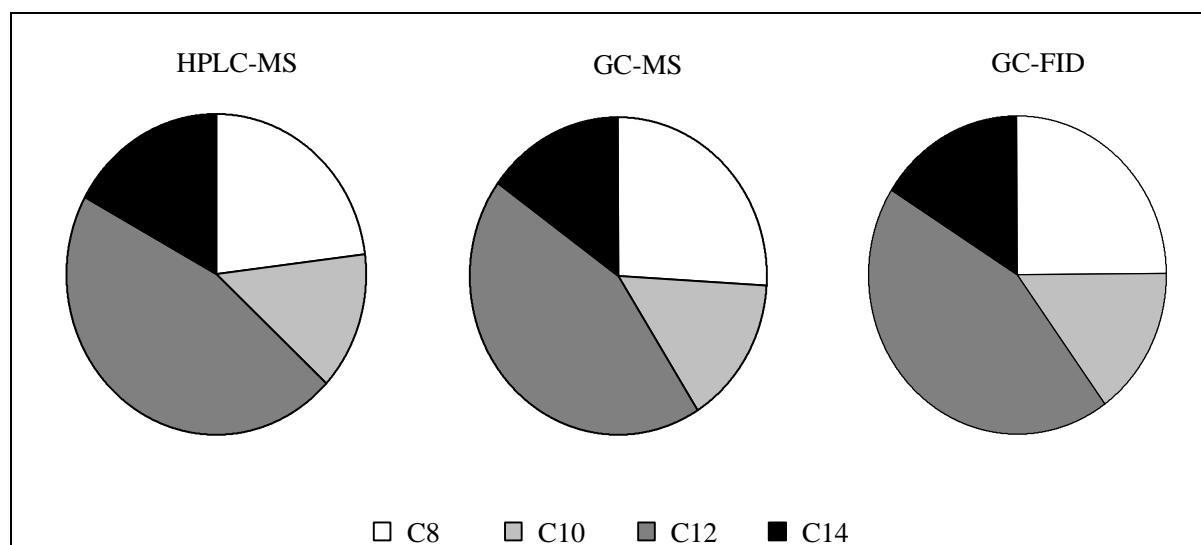


Abbildung 5-33: Alkylkettenspektren von Plantacare 818 UP

Links: Analyse mittels RP-HPLC-MS (Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside).
Mitte: Analyse mittels GC-MS (Alkylmonoglucopyranoside).
Rechts: Analyse mittels GC-FID (komplette Trockensubstanz).

Die aus der HPLC-MS-Analyse erhaltene Alkylkettenverteilung der Diglucoside weist im Verhältnis zum Alkylkettenspektrum der Monoglucoside bei allen Gemischen eine leichte Verschiebung hin zu kürzerkettigen Verbindungen auf. Bei später folgenden Analysen von APG-haltigen Kosmetika wurde diese Beobachtung bestätigt.

Einen zusammenfassenden Überblick über das Alkylkettenspektrum der untersuchten Proben als Mittel der drei analytischen Methoden wird in Tabelle 5-8 gegeben.

Tabelle 5-8: Alkylkettenspektrum technischer APG-Gemische

Gemisch	C8	C10	C12	C14
Plantacare 818 UP	25 %	15 %	45 %	15 %
Plantacare 1200 UP			75 %	25 %
Plantacare 2000 UP	34 %	21 %	34 %	11 %
Glucosid 24			76 %	24 %
Glucopon 225	49 %	51 %		

Alle prozentualen Angaben verstehen sich als Mittel der drei Analysenmethoden HPLC-MS, GC-MS und GC-FID. Der mit den einzelnen Methoden jeweils analysierbare Anteil der Trockenmasse entspricht 100 %.

5.9 Chemische Charakterisierung von Einzelkomponenten

5.9.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Analyse nichtionischer Tenside werden zumeist chromatographische Verfahren in Kombination mit geeigneten Detektionsverfahren eingesetzt. Größe und Polarität der Zielanalyten bestimmen die Methode der Wahl. Mit Ausnahme der Massenspektrometrie sind Referenzsubstanzen zur Identifizierung der Analyten notwendig. Voraussetzung für die massenspektrometrische Detektion ist die Verdampfbarkeit der Probe, d.h. die Überführung der Verbindungen in die Gasphase. Insbesondere Polymere bereiten oftmals Schwierigkeiten. Die Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization-Time Of Flight-MS (MALDI-TOF-MS), eine sogenannte Desorptionstechnik ermöglicht die Analyse intakter Oligomere wie APG, Fettalkoholethoxylate oder ethoxylierte Sulfobernsteinsäureester [Hammes et al., 1997]. Die MALDI-TOF-MS liefert absolute Molekülinformationen, die unabhängig von Referenzmaterial sind.

Eigene Untersuchungen wurden mit Glucopon 225 durchgeführt. Das MALDI-TOF-Massenspektrum reflektiert die Homologenverteilung innerhalb des Gemisches sowohl in Bezug auf die Alkylkettenverteilung als auch hinsichtlich der Zahl der gebundenen Glucoseeinheiten (Abbildung 5-34). Detektiert wurden einfach positiv geladene Natrium-Addukte. Die Doppelpeaks im Abstand von $m/z = 28$ charakterisieren die Differenz einer Ethylengruppe in den beiden Alkylketten C8 und C10. Im dargestellten Massenbereich von $m/z = 580-2050$ sind APG mit bis zu zehn Glucoseeinheiten im Molekül in einem Abstand von jeweils 162 Da sichtbar. Der Verlauf der detektierten Peakflächen in Abhängigkeit von der Zahl der gebundenen Glucoseeinheiten gibt einen Hinweis auf eine Poisson-Verteilung der einzelnen Glucosidierungsgrade. Eine Quantifizierung einzelner Gemischkomponenten über MALDI-TOF-MS war nicht möglich.

Einen besonderen Vorteil bietet die MALDI-TOF-MS hinsichtlich der Analysengeschwindigkeit, da sich die Probenvorbereitung auf das Vermischen der Probe mit der Matrix beschränkt. Insgesamt läßt sich feststellen, daß die MALDI-TOF-MS ein leistungsfähiges Instrument zur Charakterisierung polymerer Substanzgemische ist, das auch sehr gute Anwendungsmöglichkeiten in der Rohstoffanalytik, insbesondere im Bereich der Fingerprint-Analyse bietet.

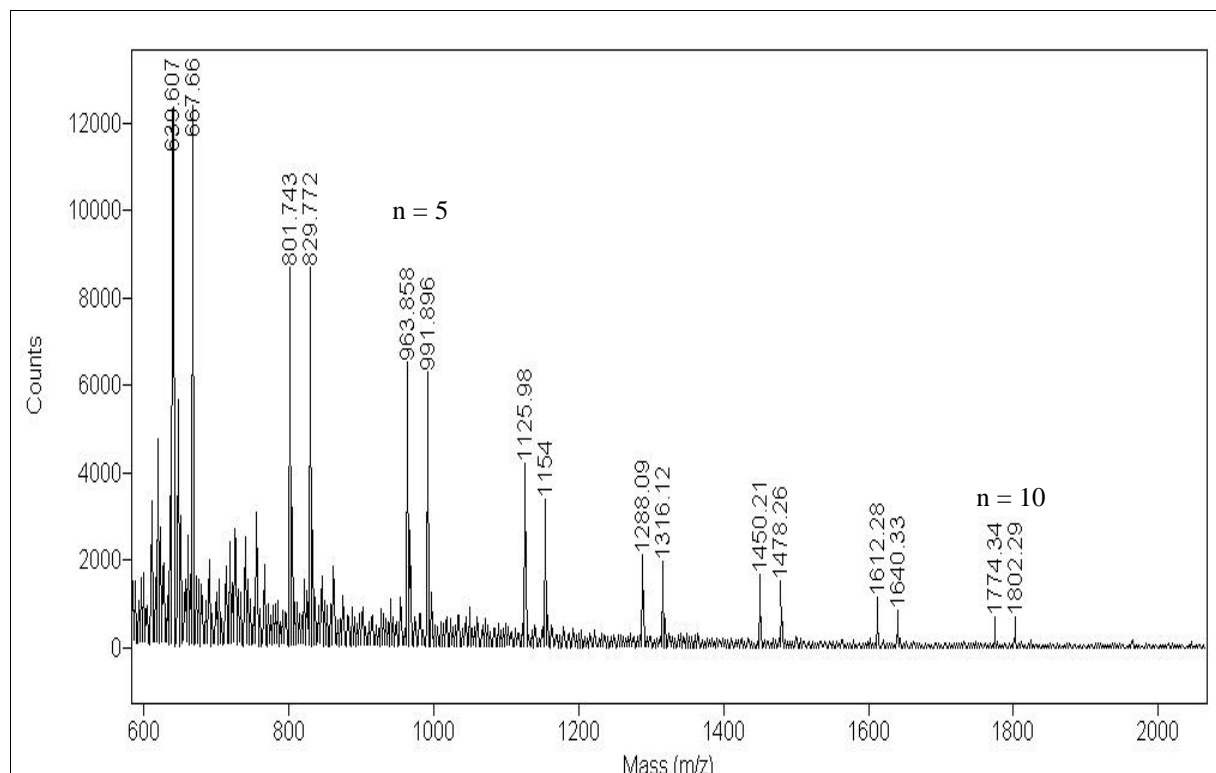


Abbildung 5-34: MALDI-TOF-Massenspektrum von Glucopon 225

Detektiert sind die Na^+ -Addukte der APG. n = Zahl der Glucoseeinheiten.

5.9.2 Bestimmung von APG an Hypercarb S

Koizumi [1996] beschreibt die flüssigchromatographische Analyse von Glucobiosen an graphitierten HPLC-Phasen. Hypercarb S erwies sich dabei als stereoselektiv. Neun isomere diglucosidische Kohlenhydrate (Anomere und Bindungsisomere) konnten vollständig getrennt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang die erfolgreiche Anwendung dieser Methode auf die Trennung von APG an Hypercarb S.

Im Gegensatz zur RP-HPLC zeigen die monoglucosidischen Anomere an Hypercarb S ein unterschiedliches Retentionsverhalten (Abbildung 5-35). α -Anomere eluieren früher als die β -Anomere. Wie schon bei der Analyse mittels GC-MS ist die typische 2:1-Verteilung der anomeren Monoglucoside erkennbar.

Noch deutlicher wird die Trennkapazität der graphitierten Phase, wenn man die SIR-Chromatogramme der Diglucoside ($m/z = 453, 481$) und der Maltotrioside ($m/z = 615, 643$) betrachtet. Während in den Ionenspuren der Diglucoside mindestens sieben Isomere nachweisbar sind, findet man in den Ionenspuren der dreifach glucosidierten Komponenten mehr als 15, zumeist unvollständig aufgelöste Peaks (Abbildung 5-36).

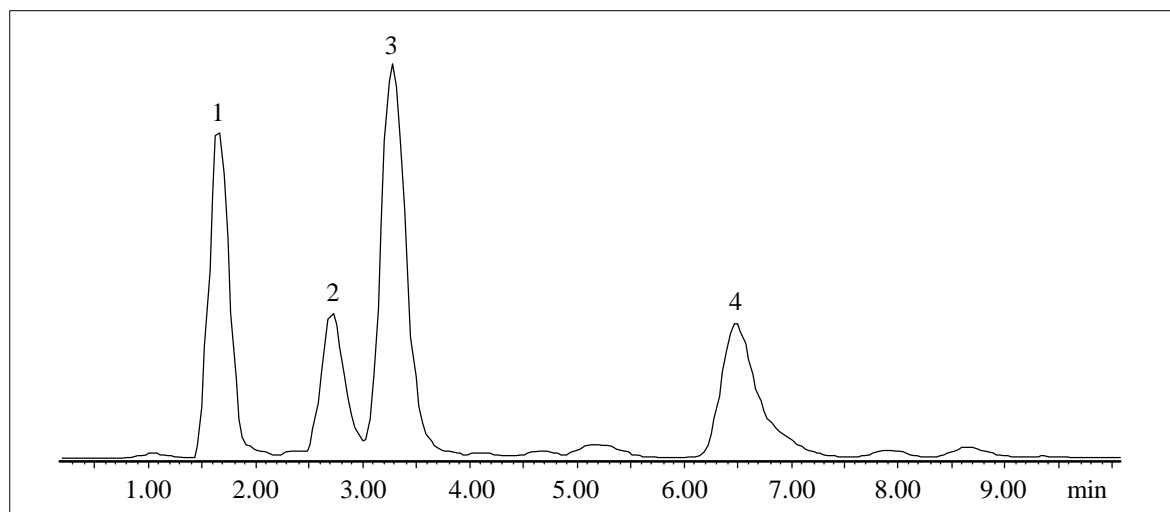


Abbildung 5-35: Trennung von Glucopon 225 an Hypercarb S

Eluent: CH_3OH , 0,4 ml/min. Detektion: APCI- (SIR-Modus).

1 = Octyl- α -Monoglucosid, 2 = Octyl- β -Monoglucosid

3 = Decyl- α -Monoglucosid, 4 = Decyl- β -Monoglucosid.

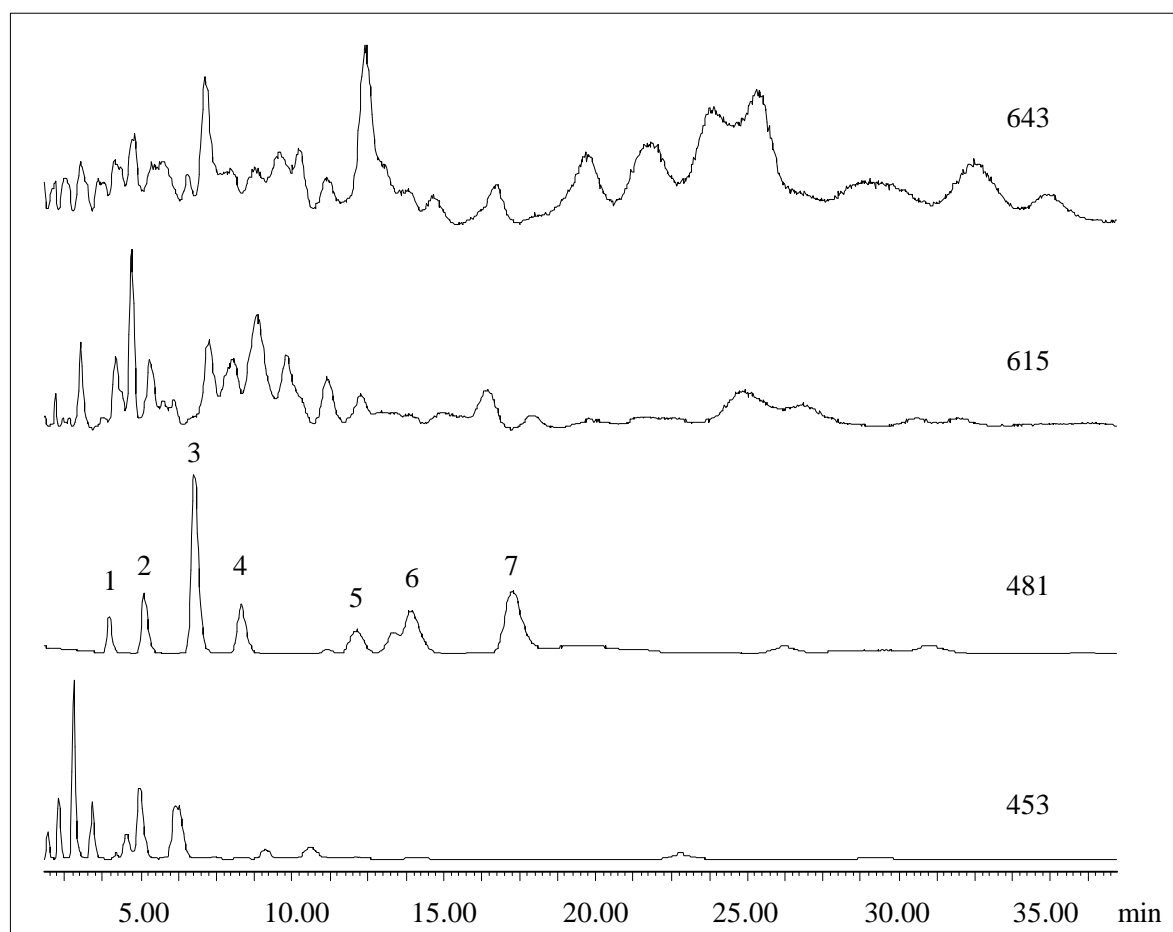


Abbildung 5-36: Trennung von oligomeren APG an Hypercarb S

Zur HPLC-MS: siehe Abbildung 5-35. Peaknumerierung: siehe Tabelle 5-10.

SIR-Spuren: C8G2 ($m/z = 453$), C10G2 (481), C8G3 (615), C10G3 (643).

Die Identifizierung der Tenside erfolgte anhand der Quasimolekülonen $[M-H]^-$. Eine genaue Identifizierung der Peaks bezüglich der Stereochemie war nur für diejenigen Komponenten möglich, die als Referenzmaterial vorhanden waren.

5.9.3 HPLC-MS/MS zur Charakterisierung von APG-Gemischen

Die massenspektrometrische Detektion von APG wurde im Verlauf dieser Arbeit mit wenigen Ausnahmen im SIR-Modus durchgeführt. Dies war bei der überwiegenden Zahl der Proben möglich. Nur in Ausnahmefällen war es erforderlich, Ergebnisse mittels Tandem-MS abzusichern.

Im Unterschied zur Elektronenstoßionisation, die fragmentreiche Massenspektren liefert, enthalten APCI-Spektren zumeist nur wenige aussagekräftige Fragmente zur Identifizierung von APG. Zur Absicherung mittels MS/MS wurden die Molekülonen mit dem ersten Massenfilter selektiert. In der Kollisionszelle zerfielen sie durch den Zusammenprall mit Argon in Fragmente, die mit dem dritten Quadrupol nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis getrennt wurden. In Anlehnung an die GC-MS wurden pro Analyt drei Zerfallsprozesse verfolgt. In Abbildung 5-37 ist die Detektion von Alkylmonoglucosiden im Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Modus dargestellt. Ausgehend von den FIA-MS/MS-Spektren wurden die drei bedeutenden Übergänge $[M-H]^- \rightarrow 101$, $[M-H]^- \rightarrow 113$ und $[M-H]^- \rightarrow 71$ zur Identifizierung der Alkylmonoglucoside detektiert. Wichtig für eine zweifelsfreie Identifizierung von APG in komplexer Matrix war sowohl das Auftreten der drei Fragmente als auch ihr relatives Verhältnis zueinander.

Erwartungsgemäß konnten bei den untersuchten Alkylmonoglucosiden alle Übergänge beobachtet werden. Das Verhältnis der Fragmente zueinander stimmte sehr gut mit den gefundenen Intensitäten aus der FIA-MS/MS-Analyse überein. Eine Identifizierung der APG war somit zweifelsfrei möglich.

Nunmehr können drei verschiedene Parameter zum Nachweis von APG herangezogen werden. Die Kombination von Retentionszeit, detektiertem Quasimolekülion $[M-H]^-$ und den drei analysierten Fragmentationen erlaubt eine eindeutige Identifizierung von APG auch in Gegenwart von komplexer Matrix. Auf eine quantitative Bestimmung von APG mittels HPLC-MS/MS wurde verzichtet. Vorversuche hatten gezeigt, daß der MRM-Modus etwa um den Faktor 100 unempfindlicher ist als die Bestimmung von APG im SIR-Modus.

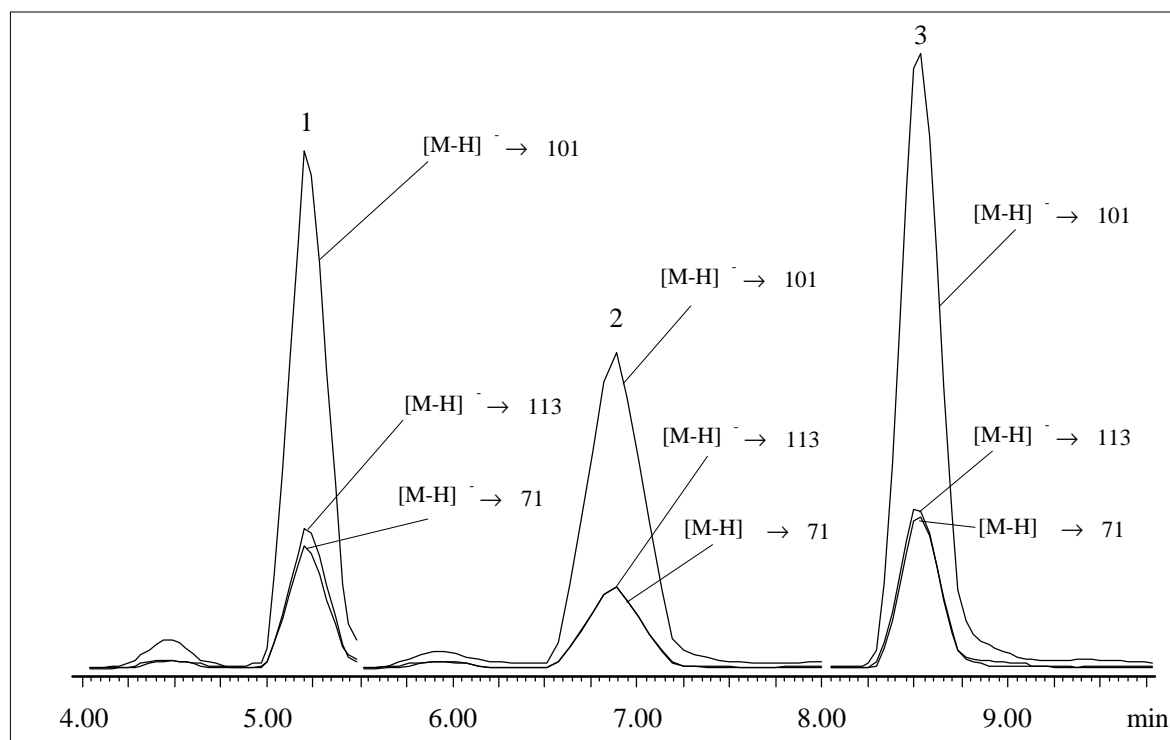


Abbildung 5-37: Identifizierung von Alkylmonoglucosiden mittels HPLC-MS/MS

Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 µm. Gradient B.

Kollisionsgas Ar 5.0 ($p = 0,0013$ mbar), CE = 17 eV.

Detektion: APCI- (MRM-Modus, Übergänge $[M-H]^- \rightarrow 71, 101, 113$).

1 = Octyl-Monoglucosid, 2 = Decyl-Monoglucosid, 3 = Dodecyl-Monoglucosid.

Ein weiteres Ziel der HPLC-MS/MS-Untersuchungen war die Charakterisierung der chemischen Struktur von APG über typische Fragmente in den MS/MS-Spektren. In Abbildung 5-38 ist die HPLC-Trennung der Decyl-Diglucoside ($m/z = 481$) von Glucopon 225 an RP-C8 dargestellt. Zur besseren Auflösung wurden isokratisch mit Acetonitril/Wasser (35+65, v/v) als Eluent gearbeitet. Abgebildet ist das TIC des MS/MS-Scans im Zeitraum von 12,5 bis 23 min. Das gefundene Peakmuster mit sechs Maxima stimmt sehr gut mit dem Peakmuster der hier nicht dargestellten Octyl-Diglucoside überein. Weiterhin kann festgestellt werden, daß sich das Peakmuster der Diglucoside aus Glucopon 225 unter gleichen HPLC-Bedingungen nicht vom Peakmuster der Diglucoside anderer technischer Gemische unterscheidet.

Stellvertretend für die sechs Peaks ist das MS/MS-Spektrum von Peak-Nr. 5 in Abbildung 5-38 eingebettet. Die MS/MS-Spektren der 6 getrennten Verbindungen stimmen in Art der Fragmente überein, es werden jedoch beträchtliche Unterschiede im relativen Verhältnis der Fragmente zueinander beobachtet (Tabelle 5-9).

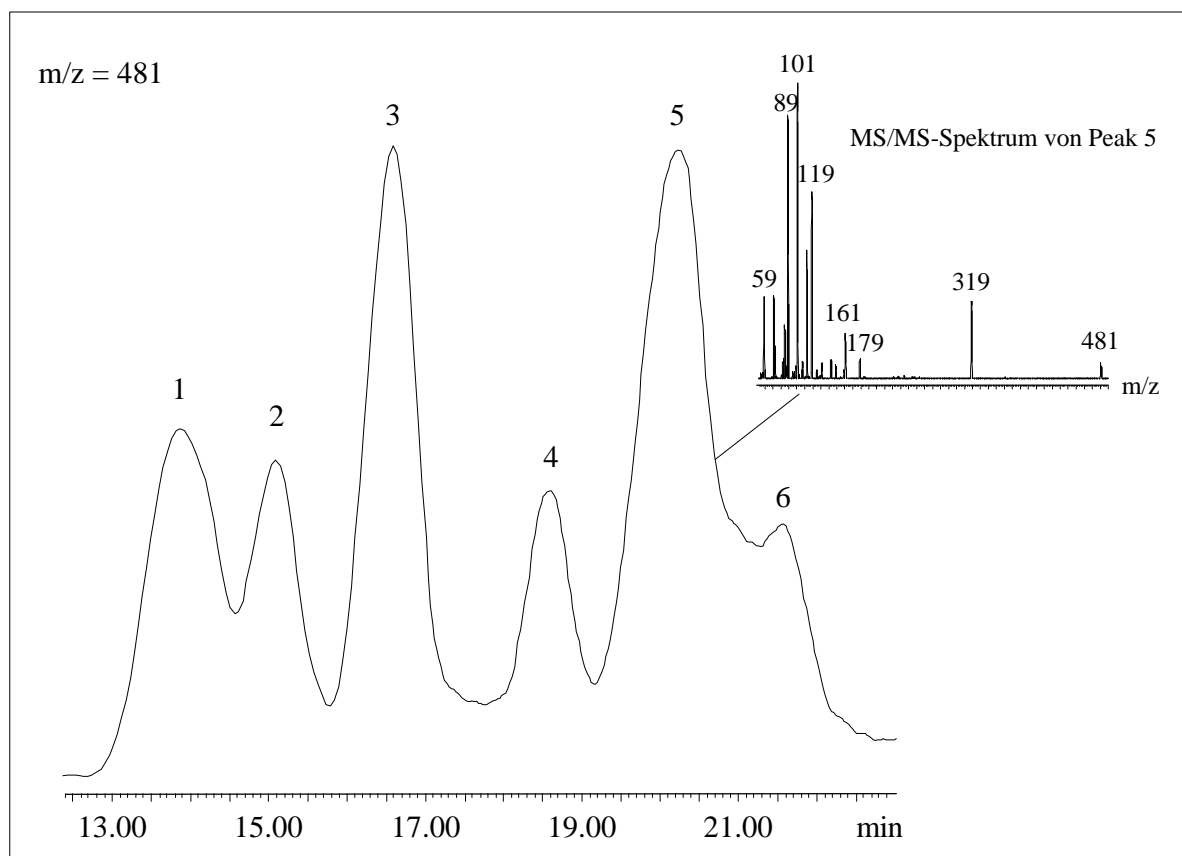


Abbildung 5-38: HPLC-MS/MS der Decyl-Diglucoside aus Glucopon 225

RP-C8-HPLC. Eluent: CH₃CN/H₂O (35+65, v/v), 1,0 ml/min, isokratisch.
 Detektion: APCI- (MS/MS-Scan, m/z = 50-500).
 Kollisionsgas: Ar (p = 0,0013 mbar), CE = 25 eV.
 Peaknumerierung erfolgte in der Reihenfolge der Retentionszeiten (12,5-23 min).

Tabelle 5-9: Wichtige Fragmente in den MS/MS-Spektren der mittels RP-C8-HPLC getrennten Decyl-Diglucoside

Peak-Nr.	Rt [min]	Basepeak	Ion 2 (rel. Int.)*	Ion 3 (rel. Int.)*	Ion 4 (rel. Int.)*	m/z		
						179 (rel. Int.)*	185 (rel. Int.)*	319 (rel. Int.)*
1	13,86	101	71 (45)	89 (40)	113 (40)	n.d.	n.d.	25
2	15,10	101	89 (80)	119 (70)	71 (35)	+	15	25
3	16,64	101	89 (80)	119 (60)	71 (35)	+	20	25
4	18,64	89	119 (80)	101 (60)	113 (30)	+	n.d.	10
5	20,22	101	89 (90)	119 (70)	113 (45)	+	n.d.	25
6	21,60	101	89 (60)	119 (40)	113 (35)	+	n.d.	25

Peaknumerierung entsprechend Abbildung 5-38.

* rel. Int.: relative Intensität des Ionenpeaks im MS/MS-Spektrum.

n.d. nicht detektiert.

+

Das MS/MS-Spektrum von Peak Nr. 6 zeigt die größte Übereinstimmung mit dem MS/MS-Spektrum von n-Decyl- β -D-Maltosid, das als Referenzmaterial vorhanden war. Sowohl die Art der Fragmente als auch ihr relatives Vorkommen korreliert sehr gut mit dem Ergebnis der MS/MS-Analyse der Referenzsubstanz. Dagegen weisen die Tochterionenspektren der Verbindungen 1 und 4 größere Unterschiede zum Referenzmaterial auf. Mit Ausnahme des Basepeaks $m/z = 101$ besitzen die übrigen Fragmente der Verbindung 1 eine verhältnismäßig geringe Intensität. Das Ion $m/z = 119$, das in den MS/MS-Spektren der Verbindungen 2-5 in Intensitäten von 40-70 % vorkommt, fehlt bei diesem Peak ebenso wie das Fragment $m/z = 179$. Verbindung 4 unterscheidet sich von den übrigen Komponenten schon allein dadurch, daß es mit $m/z = 89$ einen anderen Basepeak besitzt. Außerdem hat das Ion $m/z = 319$ nur eine Intensität von 10 %, während es in den MS/MS-Spektren der anderen fünf Verbindungen eine Intensität von etwa 25 % aufweist.

Interessante Ergebnisse bringt der Vergleich der Fragmente der Tochterionenspektren der an Hypercarb S und RP-C8 getrennten Decyl-Diglucoside aus Glucopon 225 (Tabelle 5-9 und Tabelle 5-10). Sowohl in den MS/MS-Spektren der Verbindungen 3 und 5 der Trennung an Hypercarb S als auch bei den Verbindungen 2 und 3 der RP-HPLC-Trennung konnte das Fragment $m/z = 185$ gefunden werden. Da auch das übrige Spektrum sehr gut übereinstimmt, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleichen Stereoisomere.

Ebenfalls fast identisch sind die MS/MS-Spektren der mit Nummer 1 bezeichneten Komponenten. Charakteristisch für diese Peaks ist, daß das Ion $m/z = 101$ den Basepeak bildet. Mit geringer Intensität folgen die Fragmente 71, 89 und 113.

Während bei den Peaks 6 und 7 eine Übereinstimmung der MS/MS-Spektren mit Verbindung 4 der RP-HPLC-Trennung aufgrund des Basepeaks $m/z = 89$ vorzuliegen scheint, konnte dem Peak 2 kein entsprechendes Isomer aus der RP-HPLC-Trennung zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu stimmen die MS/MS-Spektren von Komponente 4 der Trennung an Hypercarb S und von Komponente 6 der Trennung an RP-C8 so gut überein, daß es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um die gleiche Verbindung handelt.

Der Vergleich der Tochterionen-Spektren zeigt, daß es durchaus möglich ist, chemische Strukturen anhand ihrer MS/MS-Spektren zu unterscheiden. Unbefriedigend bleibt, daß es nicht gelungen ist, den verschiedenen Tochterionenspektren die entsprechenden isomeren Strukturen eindeutig zuzuordnen. Zum Verständnis des Fragmentierungsweges und den dabei entstehenden Ionen sind weitergehende MS/MS-Experimente mit chemisch reinen Stereoisomeren unumgänglich.

Tabelle 5-10: Wichtige Fragmente in den MS/MS-Spektren an Hypercarb S getrennter Decyl-Diglucoside

Peak-Nr.	Rt [min]	Basepeak	Ion 2 (Rel. Int.)*	Ion 3 (Rel. Int.)*	Ion 4 (Rel. Int.)*	m/z		
						179 (Rel. Int.)*	185 (Rel. Int.)*	319 (Rel. Int.)*
1	4,07	101	71 (40)	89 (35)	113 (35)	n.d.	n.d.	20
2	5,30	119	89 (90)	101 (60)	71 (35)	+	n.d.	20
3	7,00	101	89 (80)	119 (80)	71 (35)	+	20	35
4	8,39	101	89 (50)	113 (50)	71 (40)	+	n.d.	35
5	14,56	101	89 (90)	119 (90)	113 (45)	+	35	30
6	16,72	89	119 (90)	101 (60)	71 (35)	+	n.d.	40
7	17,80	89	119 (80)	101 (55)	113 (30)	+	n.d.	30

Peaknumerierung erfolgte entsprechend der Abbildung 5-36.

* Rel. Int.: relative Intensität des Ionenpeaks im MS/MS-Spektrum.

n.d. nicht detektiert.

+

 Ion mit einer Intensität von mehr als 5 % des Basepeaks vorhanden.

5.9.4 Identifizierung von n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid

Aus den MS/MS-Untersuchungen konnte abgeleitet werden, daß zur vollständigen chemischen Charakterisierung von flüssigchromatographisch getrennten isomeren APG-Komponenten weitere spektroskopische Verfahren angewendet werden müssen. Neben der Röntgenstrukturanalyse stellt die Kernresonanzspektroskopie (NMR) das derzeit leistungsfähigste Instrument der Strukturaufklärung von organischen Molekülen dar. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wird, eignet sich die NMR, insbesondere in Kopplung mit der HPLC hervorragend zur Identifizierung von strukturisomeren Verbindungen.

5.9.4.1 Präparative Anreicherung

Der größte Nachteil der NMR ist ihre Unempfindlichkeit. Um auswertbare ^{13}C -NMR-Spektren zu erhalten, sind in Abhängigkeit vom Meßgerät oftmals Substanzmengen im Bereich von 1-10 mg erforderlich. Ursache hierfür ist der geringe natürliche Anteil von ^{13}C -Atomen. Der Gehalt an natürlichem ^{13}C -Kohlenstoff bildet die Grundlage für die Identifizierung des Kohlenstoffgerüsts organischer Moleküle. Weniger problematisch ist dagegen die ^1H -NMR-Spektroskopie, da Wasserstoff in der Natur fast vollständig in der ^1H -Form vorliegt.

Um ein Isomer im Milligramm-Bereich zu isolieren, ist die Aufarbeitung von etwa 500 mg Trockensubstanz Glucopon 225 notwendig. Aus der quantitativen Analyse mittels RP-HPLC-MS war bekannt, daß die Trockenmasse dieser Probe etwa 15 % Diglucoside enthält. Da in Glucopon 225 zwei verschiedene Alkylketten mit einem Verhältnis von etwa 1:1 vorkommen, findet man in der Probe ca. 7 % Decyl-Diglucoside, die sich wiederum auf sechs (RP-C8) bzw. sieben (Hypercarb S) flüssigchromatographisch trennbare Isomere verteilen. Daraus läßt sich ein prozentualer Gehalt von ungefähr einem Prozent je Decyl-Diglucosid-Isomer abschätzen.

Die HPLC-Fraktionierung wurde mit einer analytischen RP-C8-Säule durchgeführt, da während der Durchführung der Experimente für die vorliegende Arbeit keine präparative HPLC-Säule zur Verfügung stand. Der hohe Anteil von monoglucosidischen Komponenten an der Trockensubstanz erfordert die Abtrennung der Monoglucoside vor der HPLC-Fraktionierung. Einerseits sollte die HPLC-Säule vor Überladung bewahrt werden, andererseits wird für eine Fraktionierung ohne Peaküberlappung die komplette Trennkapazität der HPLC-Säule benötigt. Eine "saubere" Fraktionierung ist besonders wichtig, da die Auswertung von NMR-Spektren von Gemischen isomerer Substanzen nahezu unmöglich ist.

Die Abtrennung von Alkylmonoglucosiden aus technischen APG-Gemischen beruht auf der stufenweisen Elution der APG in Abhängigkeit von ihrem Glucosidierungsgrad. Wie die Untersuchungen der verschiedenen Festphasenmaterialien auf ihr Adsorptionsvermögen gegenüber APG gezeigt haben, besitzt Methanol eine sehr hohe Elutionskraft. Die WF nach der Anreicherung aus wäßrigen Proben an ENV+ liegen im Bereich von ~ 85 %, mit Methanol werden demzufolge APG fast vollständig von der Sorbensoberfläche eluiert.

Andere Elutionsmittel wie Tetrahydrofuran, Ethylacetat oder Chloroform wurden deshalb auf eine mögliche Selektivität bei der Desorption von Alkylmonoglucosiden (C8-C12) und Alkyldiglucosiden (C8-C12) von der Oberfläche des ENV+ getestet. Das jeweilige Eluat wurde mittels FIA-MS untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß ein Elutionsmittelgemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat eine hervorragende Selektivität bezüglich der Trennung von APG nach dem Glucosidierungsgrad besitzt. Nach dem Trocknen der Festphase wurde in zwei Schritten eluiert. Zuerst erfolgte die Elution der Monoglucoside mit dem Gemisch aus Cyclohexan und Ethylacetat, anschließend wurden die Verbindungen höheren Glucosidierungsgrades mit reinem Methanol von der Festphase desorbiert. Gute Ergebnisse wurden erreicht, wenn das erste Elutionsmittel aus jeweils 50 % Cyclohexan und Ethylacetat bestand. Wenn in beiden Elutionsschritten mit 5 ml eluiert wurde, belief sich die WF der

Monoglucoside in der ersten Fraktion auf etwa 60 %, in der zweiten Fraktion, der Methanol-Fraktion wurden etwa 90 % der dotierten Alkyldiglucoside gefunden.

Da der Anteil der Alkylmonoglucoside in der Methanol-Fraktion noch immer sehr hoch war, wurden weitergehende Optimierungsversuche unternommen. Eine deutliche Verbesserung konnte durch die Erhöhung des Elutionsvolumens im ersten Schritt auf 15 ml erreicht werden (Abbildung 5-39). In der zweiten Fraktion waren dann in Abhängigkeit von der Alkylkettenlänge nur noch 10-17 % der Monoglucoside detektierbar, während die eingesetzten Diglucoside zu mehr als 85 % in dieser Fraktion gefunden werden konnten.

Der Einfluß der Alkylkettenlänge auf die WF war bei den Monoglucosiden stärker als bei den Diglucosiden. Der Abreicherungsgrad sinkt mit abnehmender Länge des Alkylrestes. Kürzerkettige Alkylmonoglucoside sind polarer als langkettige Verbindungen, damit sinkt ihre Löslichkeit im Elutionsgemisch Cyclohexan/Ethylacetat und die WF in der Methanol-Fraktion steigt.

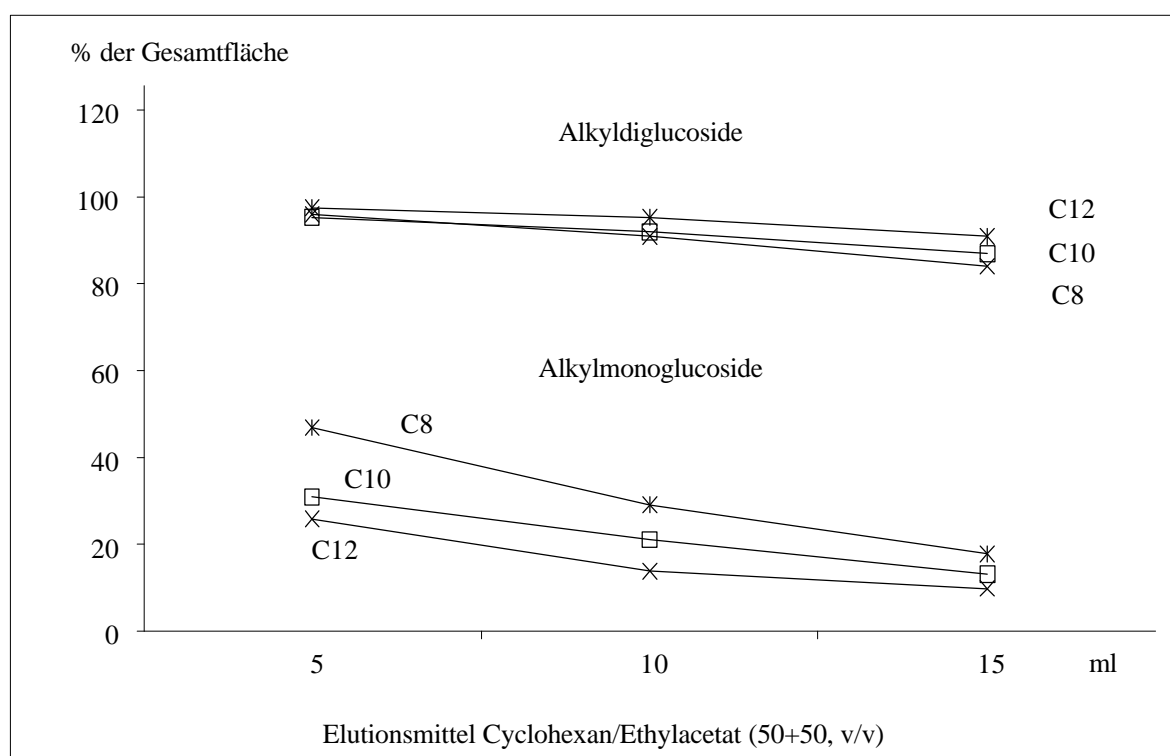


Abbildung 5-39: Desorption von APG in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen - Wiederfindung von APG in der Methanolfraktion nach Elution mit verschiedenen Mengen Cyclohexan/Ethylacetat

Probe: Standardgemisch von C8-C12G1 und C8-C12G2 (200 µg/10 ml Wasser).

SPE: 200 mg ENV+ (6 ml-Kartusche).

Elution: 1. Cyclohexan/Ethylacetat (50+50, v/v); 2. 2,5 ml Methanol.

Unter Mitarbeit von Frau Orodovskaia im Rahmen einer Praktikumsarbeit wurde schließlich eine Art Doppel-SPE entwickelt, d.h. die Probe wurde unter den gleichen Bedingungen ein zweites Mal extrahiert. Die Methanol-Fraktion der ersten Aufarbeitung wurde nach dem Trocknen mit 5 ml Wasser aufgenommen und erneut an ENV+ "gereinigt". Damit konnte insgesamt eine Abreicherung der drei Alkylmonoglucoside des Standardgemisches von mehr als 97 % erreicht werden, während von den Alkyldiglucosiden nur etwa 15-20 % "verloren" wurden. "Verloren" heißt, daß die Diglucoside schon im ersten Elutionsschritt vom Sorbensmaterial ENV+ eluiert wurden und somit für die weitere Strukturaufklärung nicht zur Verfügung standen.

Die Leistungsfähigkeit der entwickelten Doppel-SPE wird in Abbildung 5-40 demonstriert. Gegenübergestellt sind die TIC von originalem Glucopon 225 sowie der aufgereinigten Probe. Die HPLC-Trennung wurde dabei an Hypercarb S durchgeführt. Während in der Originalprobe die Anomeren der beiden Monoglucoside C8 und C10 das HPLC-Chromatogramm eindeutig dominieren, enthält das TIC der aufgearbeiteten Probe zahlreiche Peaks. Neben den Resten von Monoglucosiden handelt es sich in der Hauptsache um Diglucoside, wie die Extraktion der Moleküle mit $m/z = 453$ und 481 aus dem TIC bestätigte (ohne Abbildung). Die zuvor alles überdeckenden Monoglucoside stellen in der gereinigten Probe nur noch einen kleinen Anteil dar.

Insgesamt wurden 500 mg Trockensubstanz des Gemisches Glucopon 225 mittels Doppel-SPE an ENV+ aufgearbeitet. Um Überladungen der Festphase zu vermeiden, wurden fünf Ansätze zu je 100 mg analog aufgearbeitet. Die fünf resultierenden Methanol-Eluat der zweiten SPE wurden schließlich vereinigt und zur Trockne eingeengt. Zur Fortführung der Untersuchungen wurde der verbliebene Rückstand in 4 ml HPLC-Laufmittel aufgenommen. Damit betrug die Konzentration der diglucosidischen APG-Isomere je Analyt etwa 1 mg/ml.

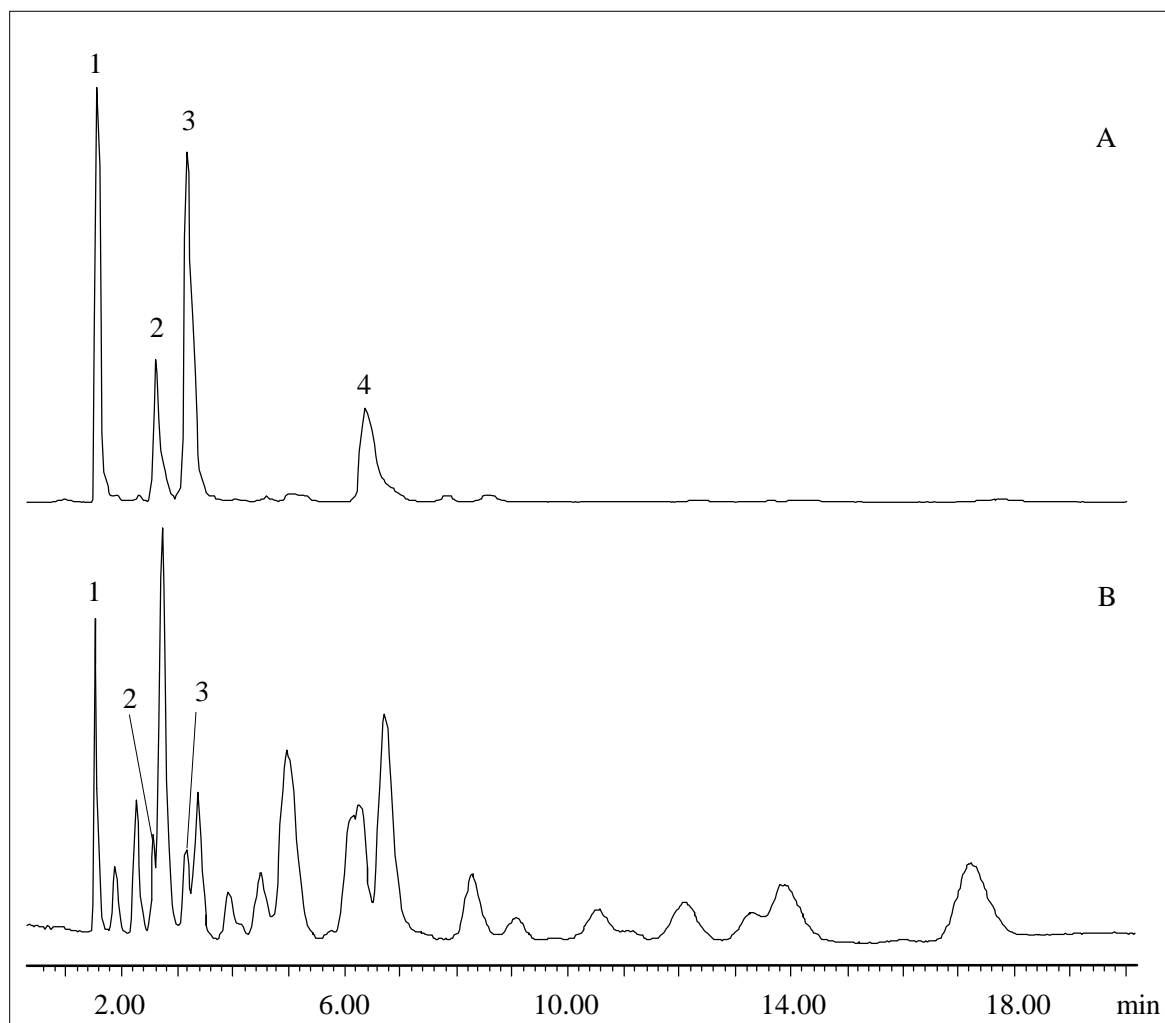


Abbildung 5-40: Glucopon 225 vor und nach Aufreinigung mittels Doppel-SPE

HPLC-Trennung an Hypercarb S. Eluent: CH_3OH , 0,4 ml/min.

Detektion: APCI- (Full-Scan, $m/z = 285\text{--}500$).

A: Glucopon 225 (Originalprobe).

B: Glucopon 225 nach Doppel-SPE an ENV+.

1 = Octyl- α -Monoglucosid, 2 = Octyl- β -Monoglucosid

3 = Decyl- α -Monoglucosid, 4 = Decyl- β -Monoglucosid.

5.9.4.2 Untersuchung von Glucopon 225 mittels HPLC- ^1H -NMR

Die aufgereinigte Probe von Glucopon 225 wurde mittels HPLC- ^1H -NMR analysiert (Abbildung 5-41). Die Trennung des Substanzgemisches erfolgte an einer RP-C8-Phase. Als Laufmittel wurde CH_3CN und D_2O eingesetzt (40+60, v/v). Durch die Verwendung von D_2O konnten die im Spektrum dominanten Signale des Lösungsmittels auf den Anteil von unvollständig deuteriertem Wasser reduziert werden. Mit Hilfe spezieller Puls-Sequenzen gelang es dann schließlich, die noch verbliebenen Lösungsmittelsignale weitgehend aus den NMR-Spektren zu eliminieren.

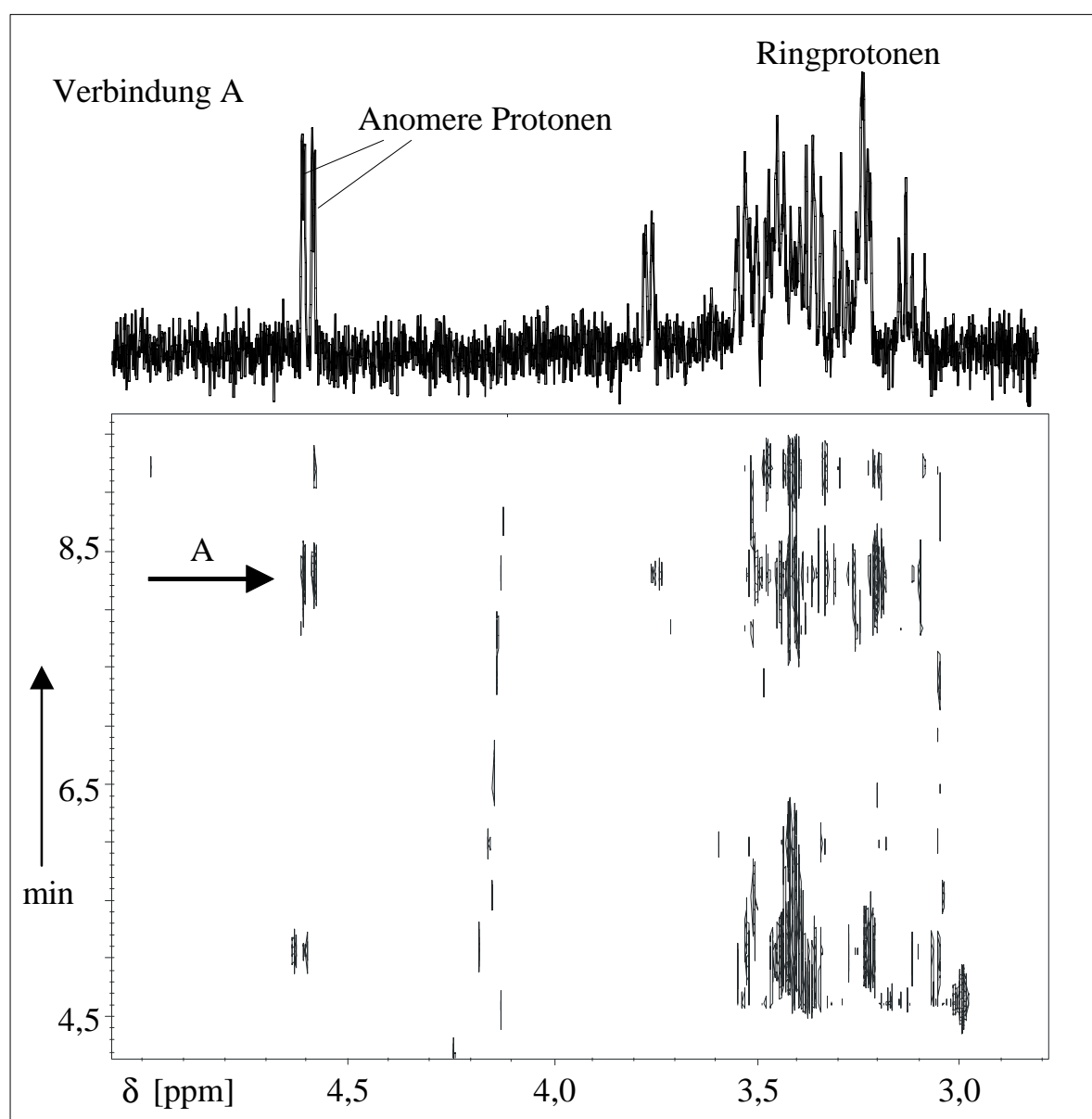


Abbildung 5-41: HPLC- ^1H -NMR-Analyse von Alkyl-Diglucosiden

Nucleosil 100 RP-C8, 250 x 4,6 mm, 5 μm . Eluent: CH_3CN (A)/ D_2O 1,0 ml/min.
 Gradient: 35 % A in 10 min auf 50 % A; in 2 min auf 80 % A; 3 min isokratisch.
 Detektion: ^1H -NMR (2,8-5,0 ppm). Probe: 100 μl Glucopon 225 nach Doppel-SPE.
 A: on-line- ^1H -NMR-Spektrum der gekennzeichneten Verbindung.

Obwohl die Konzentration der getrennten Isomere nach der Anreicherung mit 1 mg/ml verhältnismäßig hoch war, wurde im ^1H -NMR-Plot fast über die gesamte Laufzeit ein starkes Rauschen und nur eine schwache Intensität der Alkyl-Diglucoside registriert.

Eine Ausnahme bildete die bis dahin noch nicht näher charakterisierte Verbindung A, die ein gut interpretierbares on-line- ^1H -NMR-Spektrum lieferte. Die Signale im Bereich der chemischen Verschiebung zwischen 3-3,5 ppm werden durch die Protonen, die über CH-Bindungen an den Glucoseringen G1 und G2 gebunden sind, hervorgerufen (zur Nomenklatur

siehe Abbildung 5-42). Für die Charakterisierung der Struktur von großer Bedeutung ist das Signalpaar bei 4,6 ppm. Die hohe Elektronegativität der zwei Sauerstoffatome in unmittelbarer Nachbarschaft bewirkt eine starke Entschirmung der anomeren Protonen an C1 und C1a, die sich in einer hohen chemischen Verschiebung (Tieffeld-Verschiebung) ausdrückt.

OH-Protonen, die für die Identifizierung der Verknüpfungsstelle der Glucosemoleküle wichtig sind, konnten bei den on-line- ^1H -NMR-Experimenten nicht detektiert werden, weil in einem protischen Lösungsmittel ein schneller Austausch der aciden Protonen gegen Deuterium aus dem Eluenten stattfindet.

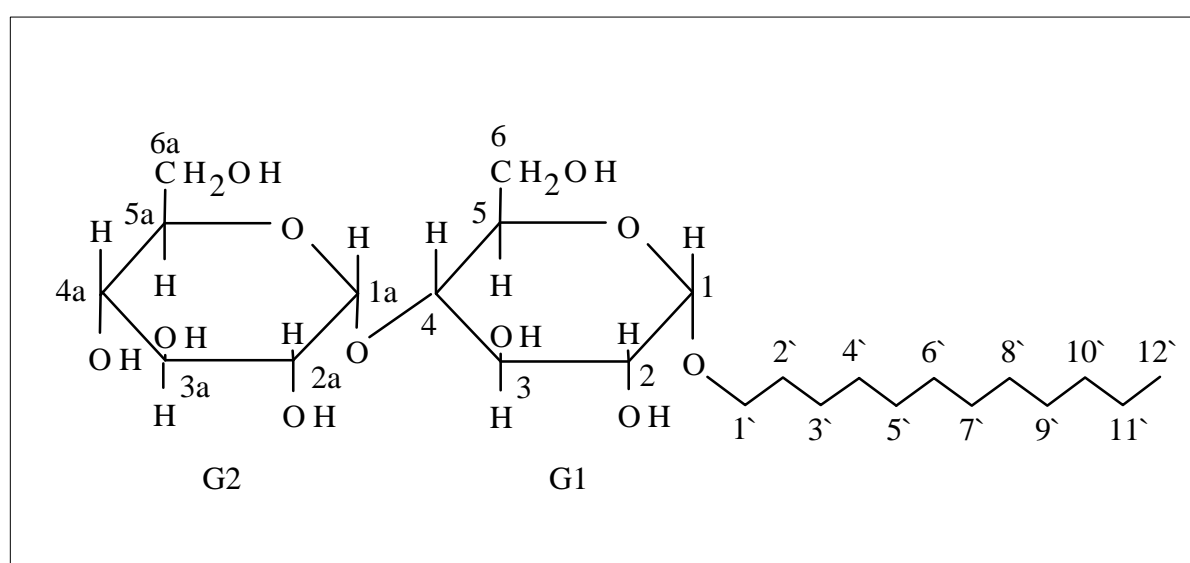


Abbildung 5-42: Nomenklatur von n-Dodecyl- $\alpha(1\rightarrow4)$ Maltosid

Die Erfahrungen aus den on-line-HPLC-NMR-Untersuchungen führten zur Erkenntnis, daß für eine umfassende Strukturaufklärung des Zielanalyten A die Anreicherung durch Fraktionierung mittels HPLC und seine anschließende Analyse mit verschiedenen statischen NMR-Techniken erforderlich ist.

Zur Anreicherung wurden jeweils 40 μl der Probe in die RP-HPLC injiziert. Als Verbindung A wurde jeweils der Peak 3 (Abbildung 5-38) gesammelt. Da wegen der hohen Konzentration der Probe keine stabilen Retentionszeiten erreicht werden konnten, war eine Detektion der HPLC-Trennung unumgänglich. Dazu wurde der Lichtstredetektor eingesetzt. Vor dem Eingang des ELSD wurde das Eluat der HPLC-Säule mit einem T-Stück im Verhältnis 1:10 gesplittet, so daß der überwiegende Teil der Probe gesammelt werden konnte.

Insgesamt waren etwa 50 HPLC-Läufe notwendig, um ausreichend Substanzmenge für eine anschließende Analyse mittels ^1H - und ^{13}C -NMR zu akkumulieren.

Zur Reinheitsprüfung wurde das gesammelte Eluat eingengt und anschließend in 250 μl Eluent wieder aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde mittels HPLC-MS analysiert.

5.9.4.3 Charakterisierung von n-Decyl- $\alpha(1\rightarrow6)$ Isomaltosid mittels ^1H - und ^{13}C -NMR

Bei NMR-Experimenten dienen die chemische Verschiebung, Peakmultiplizitäten und Kopplungskonstanten zur Aufklärung der chemischen Struktur. Wichtig für eine genaue Bestimmung ist die Abtrennung des zu untersuchenden Analyten von begleitender Matrix [Spilker et al., 1996].

In Abbildung 5-43 ist das ^1H -NMR-Spektrum von C12- α -G2 gezeigt. Die Alkylprotonen des glucosidisch gebundenen Alkylrestes liefern insgesamt drei Signalgruppen im Bereich von 0,8-1,5 ppm sowie eine Signalgruppe bei $\sim 3,5$ ppm, die unter den Signalen der Ringprotonen liegt. Bei einer chemischen Verschiebung von 0,8 ppm erscheint die endständige Methylgruppe des Alkylrestes als Triplett. Die Aufspaltung zum Triplett wird durch die beiden Protonen der benachbarten CH_2 -Gruppe hervorgerufen. Die Protonen der anderen CH_2 -Gruppen des Alkylrestes erscheinen mit zwei Ausnahmen bei etwa 1,3 ppm. Aufgrund ihrer Nähe zur glucosidischen Bindung sind die Protonen des α -ständigen C-Atoms der Alkylkette im Bereich von 3,3-3,7 ppm und die Protonen des β -ständigen C-Atoms der Alkylkette bei 1,5 ppm zu finden.

Da in der ^1H -NMR alle Wasserstoff-Atome eine konstante Signalintensität liefern, läßt sich über das Integral des Signals bei 1,3 ppm die Länge des Alkylrestes eindeutig bestimmen.

Im Bereich zwischen 3 und 4 ppm befinden sich die Signale der über CH-Bindungen an den Glucosering gebundenen Protonen. Kopplungssysteme dieser Wasserstoff-Atome lassen sich über H-H-Korrelationsspektren aufklären.

Die Elektronegativität von Sauerstoff bewirkt eine hohe chemische Verschiebung der direkt an Sauerstoff gebundenen Wasserstoff-Atome. Die OH-Protonen werden deshalb im ^1H -NMR-Spektrum im Bereich von etwa 5 ppm detektiert. Durch die Wahl von DMSO- d_6 als Lösungsmittel wird ein Austausch der aciden Protonen mit Deuterium, wie aus der HPLC-NMR-Kopplung bekannt, unterdrückt. Insgesamt erscheinen in diesem Bereich der chemischen Verschiebung neun Signalgruppen, aber nur sieben davon werden von den OH-

Gruppen der Referenzsubstanz hervorgerufen. Die beiden zusätzlichen Signale entsprechen den bereits im Kap. 5.9.4.2 beschriebenen anomeren Protonen.

Die verwendete Referenzsubstanz C12- α -G2 ist chemisch durch die Verknüpfung eines linearen Dodecylrestes mit Maltose aufgebaut. Maltose stellt wiederum eine Verbindung zweier Glucosemoleküle dar. Die Glucosemoleküle sind dabei 1 \rightarrow 4-glucosidisch verknüpft, d.h. das C1-Atom des zweiten Zuckerbausteins ist über eine Acetal-Bindung mit dem C4-Atom der ersten Glucoseinheit verbunden. Räumlich gesehen stehen die Glucoseeinheiten im Maltosegrundkörper axial zueinander.

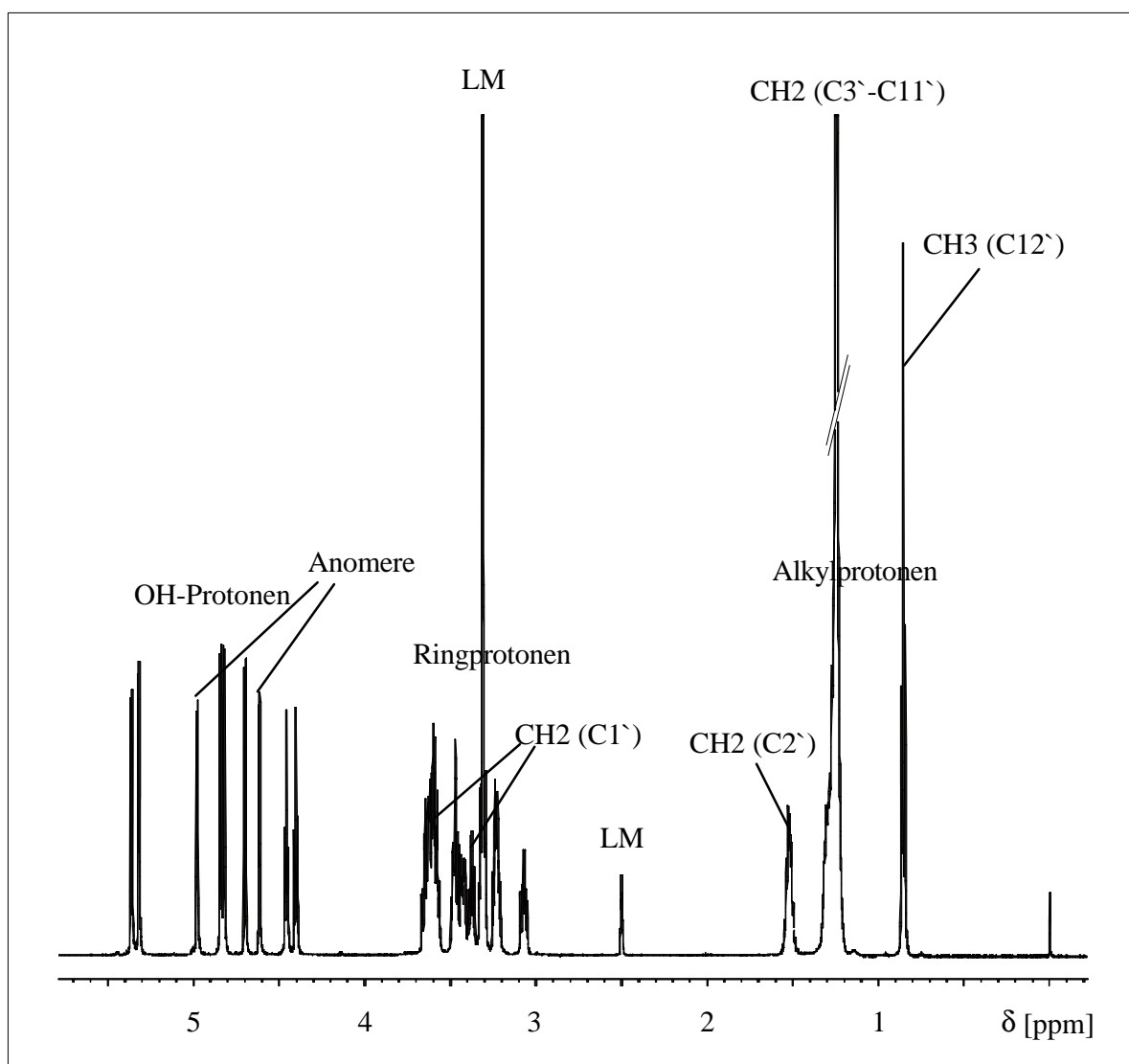


Abbildung 5-43: ^1H -NMR-Spektrum von C12- α -G2

Lösungsmittel: DMSO- d_6 .

Die untersuchte Referenzsubstanz C12- α -G2 verfügt über zwei anomere Zentren. Die α -glucosidischen Verknüpfungen bedingen in der absoluten Sesselkonformation, daß die

Ringprotonen an C2 bzw. C2a axial und an C1 bzw. C1a equatorial stehen. Der daraus resultierende Diederwinkel von jeweils $\sim 90^\circ$ führt zu Kopplungskonstanten $^3J_{1,2}$ von $\sim 3,5$ Hz. Im Gegensatz dazu findet man bei β -glucosidischen Strukturen durch die axial/axial-Stellung der $H_{1,2}$ -Protonen in den ^1H -NMR-Spektren wesentlich größere Kopplungskonstanten, die im Bereich zwischen 7 und 8 Hz liegen.

Zweidimensionale NMR-Experimente bieten über die Aufklärung miteinander koppelnder Spin-Systeme Möglichkeiten zur Identifizierung komplexer Strukturen. Stellvertretend für durchgeführte zweidimensionale Experimente ist das HSQC-Spektrum (Heteronuclear Single Quantum Coherence) der Referenzsubstanz C12- α -G2 abgebildet. Es zeigt die Korrelation zwischen ^{13}C - und ^1H -Atomen. Protonen, die direkt an Sauerstoff gebunden sind, können nicht detektiert werden (Abbildung 5-44).

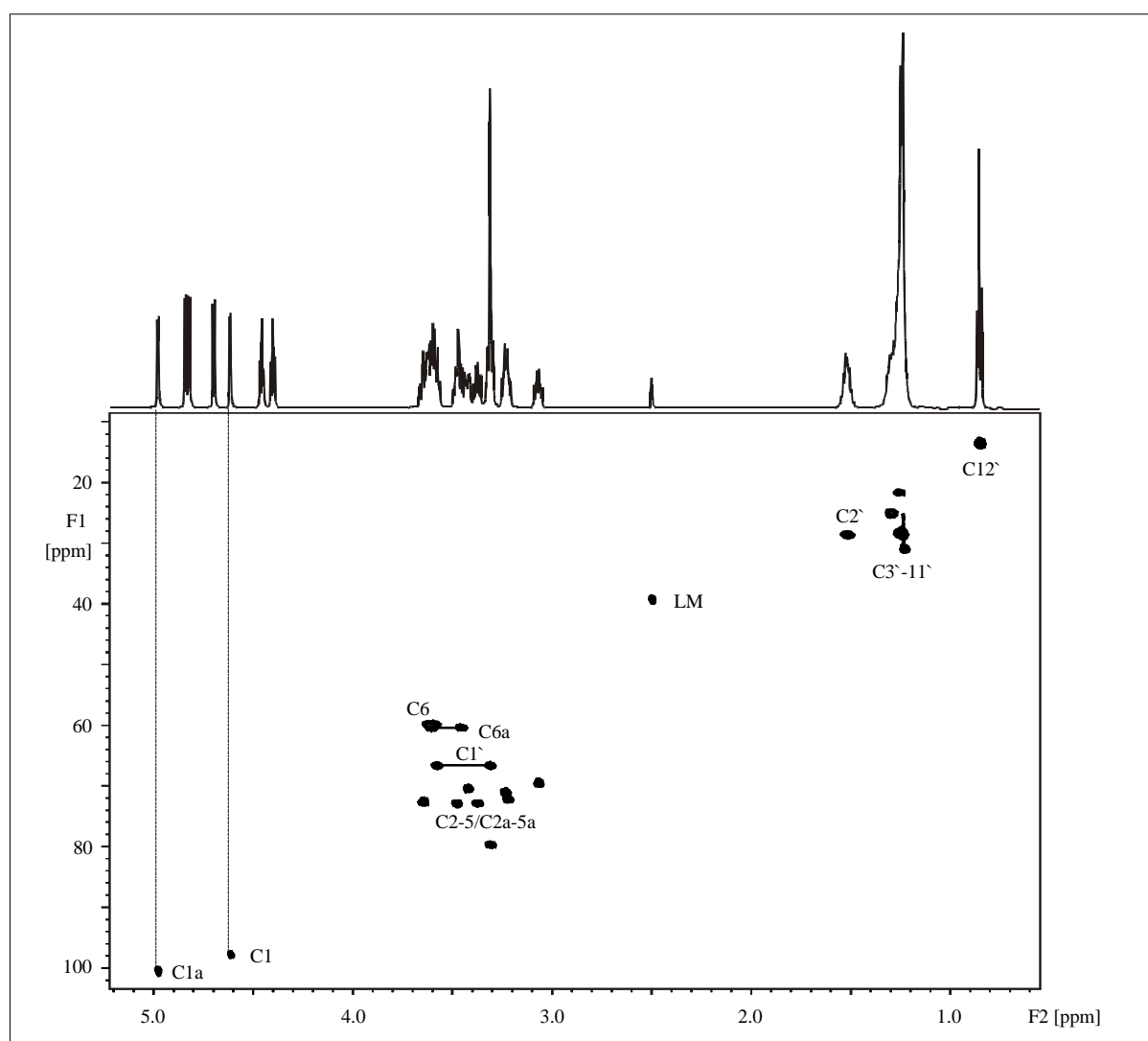


Abbildung 5-44: HSQC-NMR-Spektrum (600 MHz) von C12- α -G2

Lösungsmittel: DMSO- d_6 (LM: Restwasser im Lösungsmittel DMSO- d_6).

Der isolierte Zielanalyt A wurde mit den gleichen NMR-Techniken wie die Referenzsubstanz untersucht. Aus der Reinheitsprüfung mittels HPLC-MS war bereits bekannt, daß es sich beim Zielanalyten um ein Decyl-Diglucosid handelt. Anhand des Molekulargewichtes konnte die Länge des Alkylrestes zweifelsfrei identifiziert werden.

Abbildung 5-45 stellt die ^1H -NMR-Spektren der Referenzsubstanz C12- α -G2 und des Zielanalyten A gegenüber. Zur Veranschaulichung ist die Darstellung auf den Bereich der OH-Protonen und die Protonen am anomeren Zentrum beschränkt. Beide Spektren weisen jeweils neun Signalgruppen auf. Im Vergleich zur Referenzsubstanz ist die chemische Verschiebung der Signale beim Zielanalyten A zumeist etwas kleiner. Die Hochfeld-Verschiebung des Signals für das anomere Zentrums C1a liefert ein erstes wichtiges Indiz dafür, daß das Molekül A eine andere räumliche Struktur besitzt als die Referenzsubstanz.

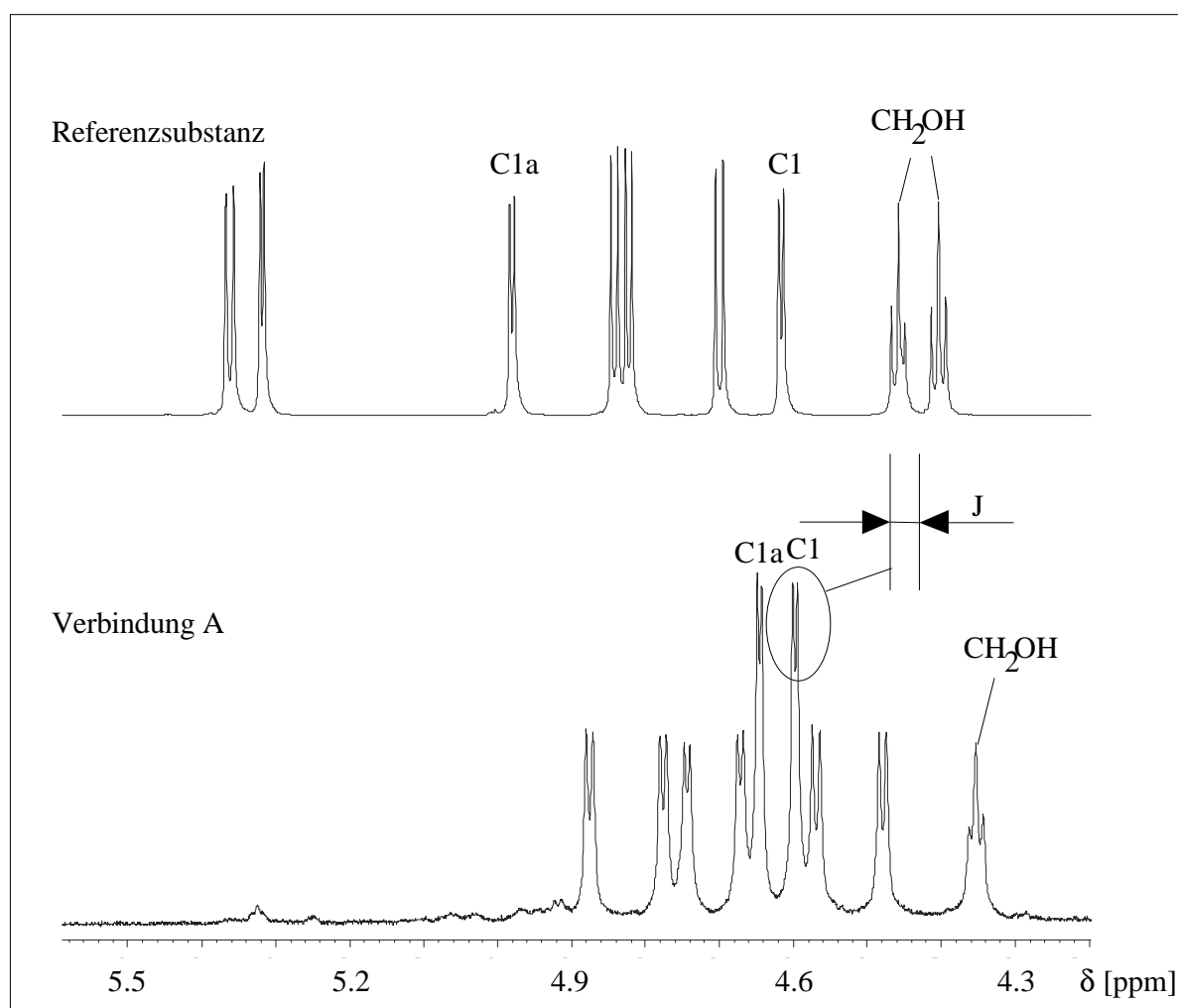


Abbildung 5-45: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der Referenzsubstanz C12- α -G2 und des Zielanalyten A

Lösungsmittel: DMSO- d_6 . C1, C1a: Anomere Zentren. J = Kopplungskonstante.

Die Kopplungskonstanten $J_{1,2}$ und $J_{1a,2a}$ betragen beim Zielanalyten A für beide anomeren Zentren $\sim 3,5$ Hz. Somit weist die Verbindung ebenso wie die Referenzsubstanz eine α -glucosidische Verknüpfung der Glucoseeinheiten und eine α -glucosidische Bindung des Alkylrestes auf.

Die Identifizierung des Bindungsortes der beiden Glucosemoleküle gelang ohne große Probleme. Die Referenzsubstanz n-Dodecyl- α -Maltosid, deren Glucoseeinheiten von C1a nach C4 verknüpft sind, besitzt im Bereich von $\delta = 4$ ppm zwei charakteristische Triplets der beiden OH-Protonen der CH_2OH -Gruppen. Die Aufspaltung der Signale zu Triplets wird durch die Protonen der benachbarten $^{6,6a}\text{CH}_2$ -Gruppen hervorgerufen. Im ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung A konnte dagegen nur noch ein Triplet gefunden werden. Daraus kann geschlußfolgert werden, daß in Verbindung A nur noch eine der CH_2OH -Gruppen existiert, während die andere CH_2OH -Gruppe an der Bindung der beiden Glucoseeinheiten beteiligt sein muß. Die so nachgewiesene 1 \rightarrow 6-Verknüpfung der Glucoseeinheiten erklärt auch die starke Verschiebung des Signals für das anomere Zentrum C1a.

Auch im HSQC-Spektrum führt die 1 \rightarrow 6-Verknüpfung zu Veränderungen in den chemischen Verschiebungen der betroffenen Atome. Während bei der Referenzsubstanz die Signale der beiden Atome C6 und C6a bei 61 ppm liegen, wird das Signal des C6-Atoms der Verbindung A, das unmittelbar an der 1 \rightarrow 6-Verknüpfung beteiligt ist, zu niedrigerem Feld bei 66 ppm verschoben. Aus der Kombination aller Daten konnte die Identität der Verbindung A zweifelsfrei aufgeklärt werden. Mittels HPLC-MS konnte die Molekülmasse auf 482 g/mol bestimmt werden. Somit handelt es sich um ein Decyl-Diglucosid.

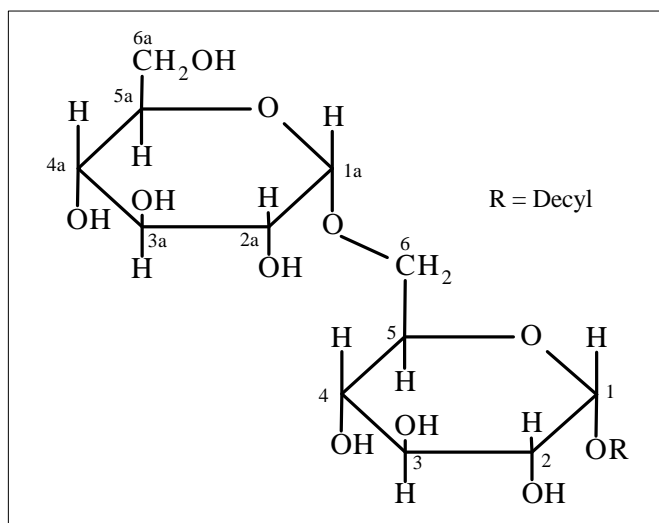


Abbildung 5-46: n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid

Aus den Kopplungskonstanten $J_{1,2}$ und $J_{1a,2a}$ wurde abgeleitet, daß der Decylrest α -glucosidisch gebunden ist, und daß die Glucosereste α -ständig verknüpft sind. Das fehlende Triplet gibt einen eindeutigen Hinweis auf eine 1 \rightarrow 6-glucosidische Verknüpfung der Glucosereste. Zusammengefaßt handelt es sich bei Verbindung A also um n-Decyl- α (1 \rightarrow 6) Isomaltosid (Abbildung 5-46).

5.10 Bestimmung von APG in Fertigprodukten

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Analysenmethoden zur Bestimmung von APG wurden in der dritten Projektphase auf Produktformulierungen aus dem Handel angewendet. Dies war von besonderem Interesse, da die Bedarfsgegenstände über das Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz unmittelbar zum Arbeitsgebiet von Lebensmittelchemikern zählen.

Bisher sind nur wenige Analysenmethoden zu quantitativen Bestimmung von Produktformulierungen bekannt. Buschmann und Wodarczak [1995] haben APG nach ihrer Umsetzung mit Anthron photometrisch als Summenparameter erfaßt. In ihren Untersuchungen wurden die Gehalte an APG in Duschbädern und Handgeschirrspülmitteln quantitativ ermittelt. Die gefundenen Konzentrationen lagen zwischen 1,1 und 11,6 Gewichts%. Klaffke et al. [1998] fanden mittels HPTLC in pulverförmigen Waschmitteln APG-Gehalte von etwa 1,8 %. Die Genauigkeit dieser Bestimmungen kann nur schwer überprüft werden, da Herstellerangaben zumeist fehlen. Aus Mangel an geeigneten Analysenmethoden wurden die Gehalte nur mit einer Methode bestimmt. Systematische Fehler, beispielsweise durch Matrixeffekte waren somit kaum zu erkennen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte Handelsprodukte mit allen im Verlaufe dieser Arbeit etablierten Verfahren zu untersuchen und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

5.10.1 Ermittlung der Trockenmasse

Zuerst wurde die Trockenmasse der Handelsproben (vier Duschbäder, zwei Flüssigwaschmittel und ein Schaumbad, vgl. auch Kap. 4.1.4) mittels Gefriertrocknung bestimmt. Die Werte (Tabelle 5-11) liegen zwischen 15 und 21 %. Eine Ausnahme bildet „Persil flüssig“ mit einem Trockensubstanzgehalt von fast 60 %. Die Angaben stellen Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar, deren relative Standardabweichung kleiner als 3 % war.

Da die Analysen über drei Jahre hinweg durchgeführt wurden, war es notwendig, die Trockenmasse, die häufig Ausgangspunkt der quantitativen Bestimmungen war, in gewissen Abständen zu erneuern. Veränderungen der Trockensubstanz während der Lagerung durch Licht, Feuchtigkeit oder Sauerstoff konnten so weitgehend ausgeschlossen werden. Die Abweichungen bei der Bestimmung der Trockenmasse über den gesamten Versuchszeitraum waren nicht größer als die relative Standardabweichung innerhalb eines Versuchsansatzes.

Tabelle 5-11: Trockenmasse analysierter Kosmetika und Waschmittel

	Produktklasse	Trockenmasse [%]
Fa	Duschbad	18,7 ± 0,5
Nivea	Duschbad	20,8 ± 0,6
Palmolive	Duschbad	15,1 ± 0,3
Tamara	Duschbad	-
Persil	Flüssigwaschmittel	59,1 ± 1,7
Perwoll	Flüssigwaschmittel	20,4 ± 0,5
Badedas classic	Schaumbad	19,9 ± 0,3

Angegeben sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten aus drei Analysen.

5.10.2 GC-MS-Analyse von APG in Fertigprodukten aus dem Handel

APG können nach Silylierung mittels GC-MS analysiert werden. Die massenselektive Detektion ermöglicht die Bestimmung auch solcher Komponenten, die nicht als Referenzmaterial zur Verfügung stehen. Charakteristische Fragmente in den EI-Spektren erlauben eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen. Probleme bereiten höher glucosidierte APG, die selbst nach Derivatisierung nicht zufriedenstellend gaschromatographierbar sind. Im Mittel sind 42 % der Trockenmasse technischer APG-Gemische quantitativ bestimmbar.

Die bei der Analyse technischer APG-Gemische gesammelten Erfahrungen wurden auf die Untersuchung von Fertigprodukten übertragen. Die Extraktion der APG aus der komplexen Matrix beschränkte sich auf die Wahl eines semiselektiven Lösungsmittels. Da DMF in der Kohlenhydratchemie als gutes Lösungsmittel für Zucker und Zuckerderivate bekannt ist, wurde der Rückstand der Gefriertrocknung in 2 ml DMF aufgenommen. Ungelöste Probenbestandteile wurden durch Membranfiltration beseitigt. Ein Aliquot (1 ml) wurde unter Stickstoff getrocknet und anschließend silyliert. Dabei stellte sich heraus, daß die Derivatisierung mit Tril Sil[®] sehr unselektiv verläuft (Abbildung 5-47). Besonders im vorderen Teil des TIC sind zahlreiche Peaks zu erkennen, die von anderen Inhaltsstoffen stammen. Obwohl die Extraktion des Ions 204 zu einfachen, leicht interpretierbaren Chromatogrammen führt, wurde in den weiteren Versuchen mit BSTFA silyliert. Hierbei werden erheblich weniger Inhaltstoffe detektiert (Abbildung 5-48). Zudem waren die Peakflächen der mit BSTFA umgesetzten Proben in der Ionenspur 204 sehr reproduzierbar.

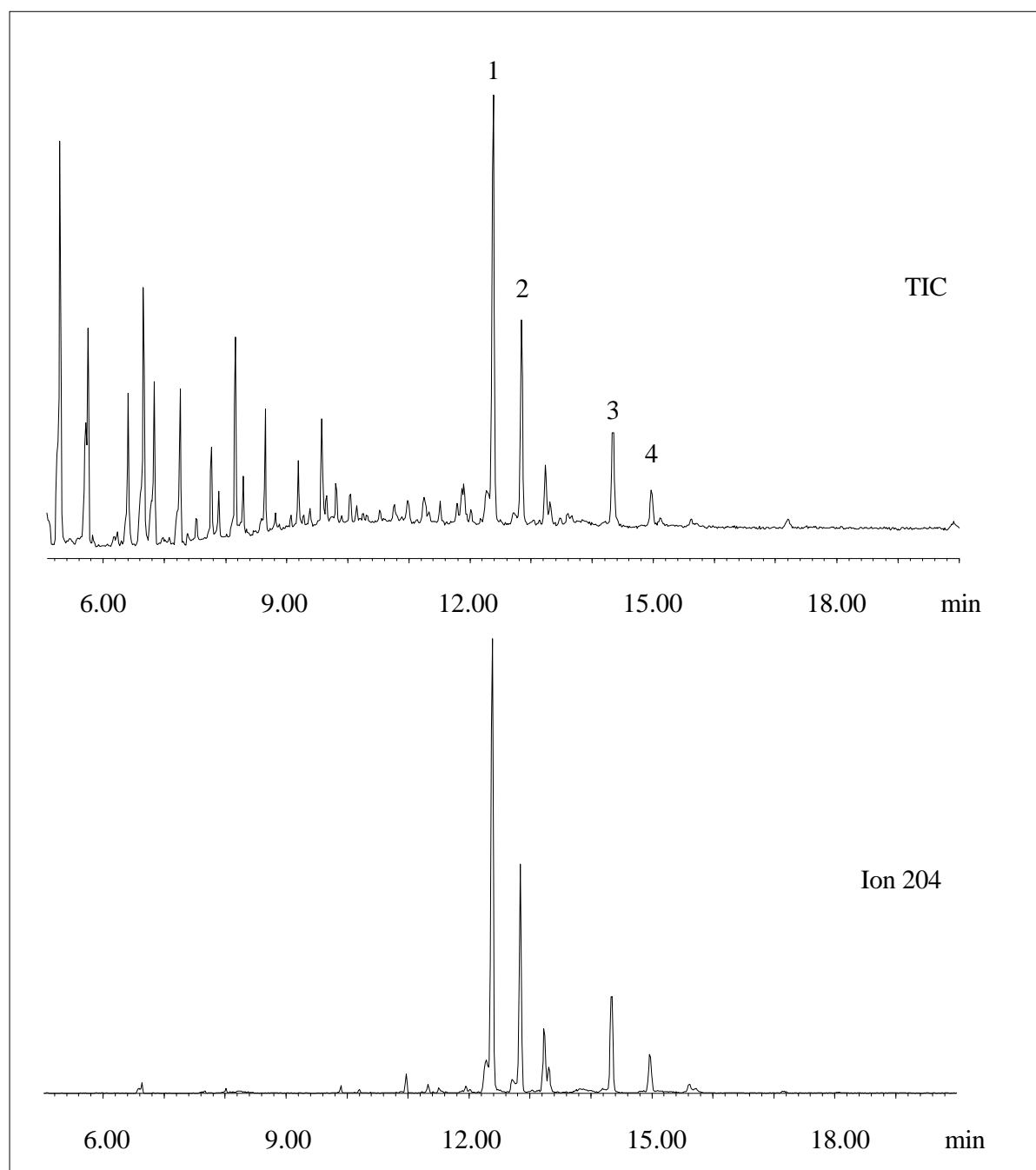


Abbildung 5-47: GC-MS-Analyse des Duschbades "Palmolive" nach Silylierung mit Tril Sil[®]

8,9 mg Trockensubstanz mit Tril Sil[®] derivatisiert.

Oben: TIC, Unten: RIC (m/z = 204).

1 = Dodecyl- α -D-Monoglucopyranosid, 2 = Dodecyl- β -D-Monoglucopyranosid

3 = Tetradecyl- α -D-Monoglucopyranosid, 4 = Tetradecyl- β -D-Monoglucopyranosid.

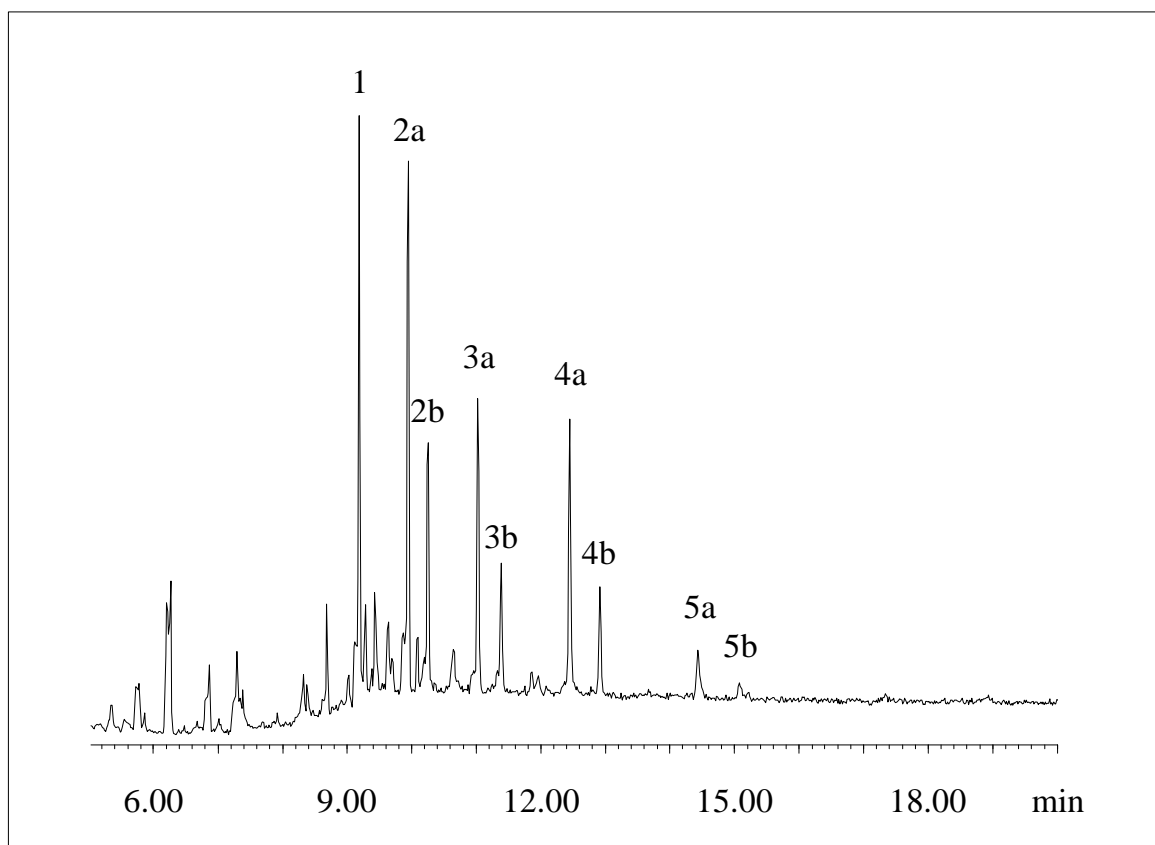


Abbildung 5-48: GC-MS-Analyse des Duschbades "Nivea" nach Silylierung mit BSTFA

1 = Heptyl-β-D-Monoglucopyranosid (ISTD), 2 = Octyl-D-Monoglucopyranosid,
3 = Decyl-D-Monoglucopyranosid, 4 = Dodecyl-D-Monoglucopyranosid,
5 = Tetradecyl-D-Monoglucopyranosid. (a: α-Anomer, b: β-Anomer)

Eine zuverlässige Quantifizierung der über die Retentionszeit und über das charakteristische Fragment $m/z = 204$ identifizierten Alkylmonoglucopyranoside war trotz der komplex zusammengesetzten Matrix möglich. Die quantitative Auswertung erfolgte über den ISTD C7G1. Aus den Totalionenchromatogrammen wurde das Ion 204 als Basepeak aller pyranosiden Alkylmonoglucoside extrahiert. Aus Mangel an Referenzmaterial wurde der Gehalt der C14-Komponenten über den Responsefaktor der Verbindung C12G1 ermittelt. Die anomeren Komponenten wurden über den Responsefaktor der β-glucosidischen APG quantifiziert.

Aus den Analysen technischer Formulierungen war bekannt, daß unter den gewählten Analysenparametern Bedingungen weniger als die Hälfte aller APG quantitativ erfaßbar sind. In Erwartung ähnlicher Verhältnisse bei den Handelsproben wurde der ermittelte APG-Gehalt mit dem Korrekturfaktor 2,38 multipliziert. Der Faktor ergibt sich als Quotient der kompletten Trockenmasse und dem mittleren quantifizierbaren Anteil von 42 %. Die in Tabelle 5-12

angegebenen Ergebnisse stellen Mittelwerte aus drei Analysen dar. Der Anteil von APG an der Trockenmasse der Fertigprodukte liegt unter Berücksichtigung des Korrekturfaktors zwischen 4 und 16 %. Die maximalen Werte werden durch die untersuchten Flüssigwaschmittel Perwoll und Persil erreicht. Duschbäder weisen allgemein einen relativ geringen Anteil an APG auf. Er liegt für die drei positiven Proben bei 5-8 %, im Duschbad "Tamara" wurden keine APG gefunden.

Tabelle 5-12: GC-MS-Analyse von Fertigprodukten aus dem Handel

	Produktklasse	APG-Gehalt (ermittelt)*	APG-Gehalt (korrigiert)**	Alkylkettenspektrum (C8-C10-C12-C14)***
Fa	Duschbad	2,6 ± 0,1 %	6,2 %	0-0-77-23
Nivea	Duschbad	2,4 ± 0,2 %	5,7 %	35-22-33-10
Palmolive	Duschbad	3,2 ± 0,1 %	7,6 %	0-0-77-23
Tamara	Duschbad	-	-	-
Persil	Flüssigwaschmittel	1,7 ± 0,1 %	4,0 %	0-0-76-24
Perwoll	Flüssigwaschmittel	6,6 ± 0,2 %	15,7 %	0-0-75-25
Badedas classic	Schaumbad	6,3 ± 0,1 %	15,0 %	25-16-46-13

Die Gehalte verstehen sich als Gesamtgehalt aller Alkylmonoglucopyranoside. Angegeben ist der prozentuale Anteil an der Trockenmasse als Mittelwert aus drei Bestimmungen.

* Der ermittelte Gehalt ist der Gewichtsanteil (%) der Alkylmonoglucopyranoside an der Trockenmasse.

** Der korrigierte APG-Gehalt errechnet sich aus dem ermittelten Gehalt und dem Korrekturfaktor 2,38.

*** Das Alkylkettenspektrum (%) ergibt sich aus dem Anteil jeder Alkylkette am ermittelten APG-Gehalt.

Mit Ausnahme des Duschbades von Nivea und des Schaumbades „Badedas classic“ konnten in den Proben nur langkettige APG nachgewiesen werden. Typischerweise wurden etwa 75-80 % C12- und 20-25 % C14-Komponenten gefunden. Dagegen enthält das Duschbad von Nivea 35 % C8-, 22 % C10-, 33 % C12- sowie 10 % C14-Verbindungen. Dieses Spektrum weist eine sehr gute Übereinstimmung mit der Alkylkettenverteilung von Plantacare 2000 UP auf. Es kann davon ausgegangen werden, daß Plantacare 2000 UP oder ein ähnliches Produkt als Rohstoffbasis zur Erzeugung des Duschbades eingesetzt worden ist. Im Schaumbad "Badedas classic" wurden ebenfalls alle geradzahligen Alkylreste von C8 bis C14 gefunden. Die Verteilung 25 % C8, 16 % C10, 46 % C12 und 13 % C14 deutet auf Plantacare 818 UP als Ausgangsbasis hin.

5.10.3 GC-FID-Analyse von APG in Fertigprodukten

Die Bestimmung von APG mittels GC-FID nach saurer Hydrolyse erfordert bei matrixreichen Proben eine zusätzliche Probenvorbereitung. Die Zusammensetzung derartiger Proben (siehe

Tabelle 4-2) läßt unschwer vermuten, daß eine direkte Hydrolyse der Probe mit HCl kaum zu auswertbaren Chromatogrammen führt. Neben einer starken Belastung des GC-FID-Systems wären Peaküberlagerungen bzw. Überbefunde durch andere Probenbestandteile wie Fettalkoholethoxylate (AEO) oder Alkylethersulfaten (AES), aus denen ebenfalls Fettalkohole freigesetzt werden können, zu erwarten.

Ein von Wodarczak und Burford [1998] entwickelter Trennungsgang zur Bestimmung von APG in synthetischen Abwässern wurde dahingehend weiterentwickelt, daß eine Bestimmung der nichtionischen APG mittels GC-FID nach saurer Hydrolyse möglich wird. Im ersten Schritt erfolgt eine Anreicherung der Probe an ENV+. Aufgrund der geringen Selektivität des SPE-Materials kommt es zur Aufkonzentrierung von zahlreichen Inhaltsstoffen. Nach der Elution mit 2,5 ml Methanol wurden die Proben vorsichtig zur Trockne eingengt und anschließend in 5 ml Chloroform/Methanol (14+1) aufgenommen. Danach erfolgt eine zweite Extraktion an Kieselgel. Dabei werden APG von AEO getrennt. Versuche mit Referenzsubstanzen haben gezeigt, daß APG zu mehr als 95 % an der Oberfläche des Kieselgels adsorbieren, während AEO die Kieselgel-Säule größtenteils passieren. Nach dem Trocknen des Kieselgels erfolgt die Desorption der APG mit 2,5 ml Methanol. Direkt im Anschluß daran werden eventuell noch vorhandene ionische Tenside durch die Extraktion der Proben mit Ionenaustauschermaterial entfernt. Das Eluat der Kieselgelextraktion wird direkt auf SAX-Material überführt. APG gelangen dabei, ohne in Wechselwirkung mit dem Anionenaustauscher zu treten, in die mit SCX-Material gefüllten Kartuschen. Da auch hier keine Adsorption stattfindet, befinden sich die APG im Durchlauf der beiden ineinandergesteckten Ionenaustauschersäulen.

In Vorversuchen wurde die WF von mit Plantacare 818 UP dotiertem Leitungswasser ($c = 100 \text{ mg/l}$) nach Extraktion mit SAX- und SCX-Material untersucht. Nahezu 100 % der eingesetzten APG wurden im Durchlauf der Ionenaustauschersäulen gefunden. Versuche zur Extraktion mit Kieselgel haben gezeigt, daß die WF mit zunehmender Alkylkettenlänge leicht rückläufig ist. Die Kombination aller Extraktionsschritte (ENV+ \rightarrow Kieselgel \rightarrow SAX/SCX) führte bei dem mit Referenzmaterial bzw. mit technischen APG-Gemischen dotiertem Leitungswasser in Abhängigkeit vom Alkylrest zu WF zwischen 76 und 85 % bei relativen Standardabweichungen unter 6 %.

Das Methanol-Eluat der kombinierten SPE wird vor der sauren Hydrolyse unter leichtem Stickstoffstrom getrocknet. Der Rest wird nach Kap. 5.7 analysiert. Die Flüssig/Flüssig-Extraktion der durch die Hydrolyse freigesetzten Fettalkohole wird mit n-Nonanol normiert.

C11G2 dient zur Kontrolle der Probenaufarbeitung. Beide Verbindungen eignen sich sehr gut als ISTD. Sie besitzen die gleichen chemischen Eigenschaften wie die nachzuweisenden Analyten und sind in den Proben wegen der ungeraden Zahl an C-Atomen im Alkylrest nicht zu erwarten, wenn die nachzuweisenden APG auf der Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt worden sind.

Die Leistungsfähigkeit der ausgearbeiteten Extraktionsmethode wird in Abbildung 5-49 deutlich. Das Duschbad "Tamara", das keine APG enthält, wurde mit Plantacare 818 UP in einer Konzentration von 100 mg/l dotiert. Im Chromatogramm werden außer den erwarteten Peaks der beiden internen Standards und der vier Fettalkohole, die aus dem Gemisch Plantacare 818 UP stammen, nur noch wenige Signale mit sehr geringen Peakflächen gefunden. Eine Überlagerung mit den interessierenden Fettalkoholen, deren Identifizierung über die Retentionszeit erfolgt, wird nicht beobachtet. Da sich das Duschbad "Tamara" in seiner Zusammensetzung von den anderen Proben im Wesentlichen nur durch das Fehlen von APG unterscheidet, kann festgestellt werden, daß sich der Trennungsgang sehr gut zur Extraktion von APG aus Kosmetika sowie Wasch- und Reinigungsmitteln eignet.

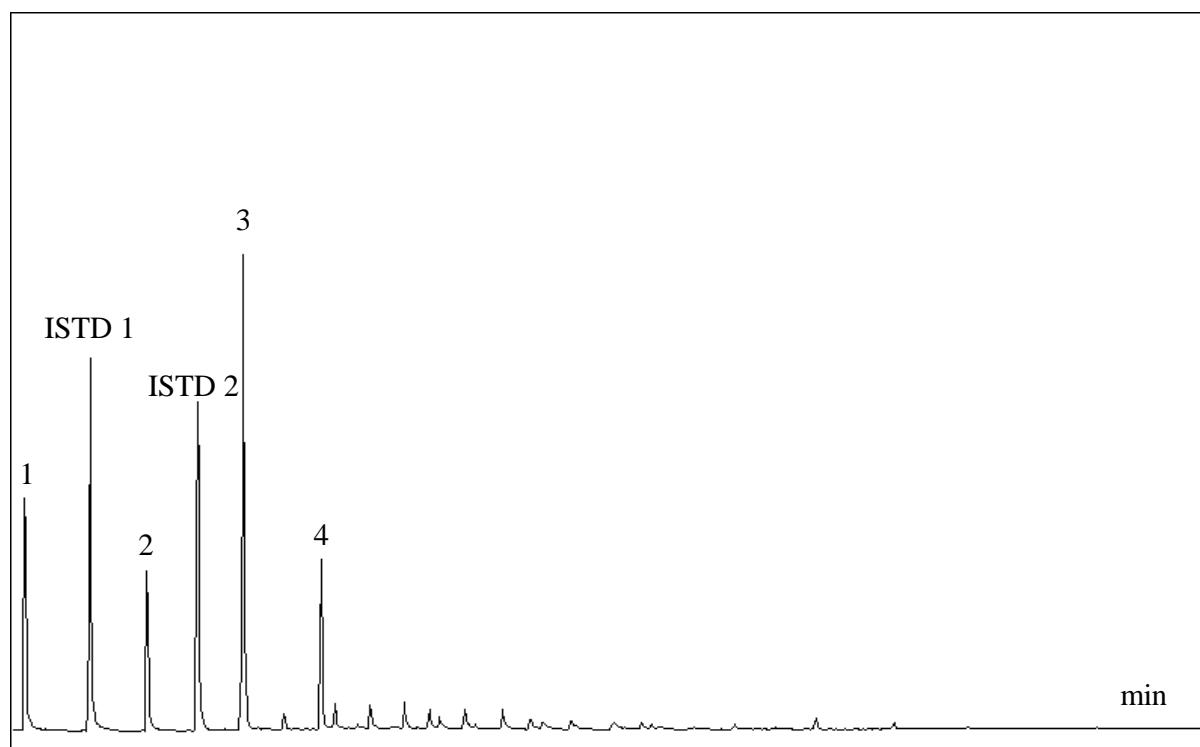


Abbildung 5-49: GC-FID-Chromatogramm der APG im Duschbad "Tamara" nach Dotierung mit Plantacare 818 UP und Hydrolyse

Probe: Duschbad "Tamara" (12,4 mg), dotiert mit Plantacare 818 UP (c = 100 mg/l).
 1 = n-Octanol, 2 = n-Decanol, 3 = n-Dodecanol, 4 = n-Tetradecanol.
 ISTD 1: n-Nonanol, ISTD 2: n-Undecanol.

Stellvertretend für untersuchte, APG-haltige Handelsproben sind in Abbildung 5-50 die Chromatogramme der Flüssigwaschmittel Persil und Perwoll abgebildet. Beide Proben enthalten ausschließlich APG mit den langkettigen Alkylresten C12 und C14. Die Signale im vorderen Bereich der Chromatogramme stammen von den beiden internen Standards. Weitere Inhaltsstoffe der Waschmittel, die eine quantitative Bestimmung der APG stören könnten, wurden durch die kombinierte SPE vor der Hydrolyse entfernt.

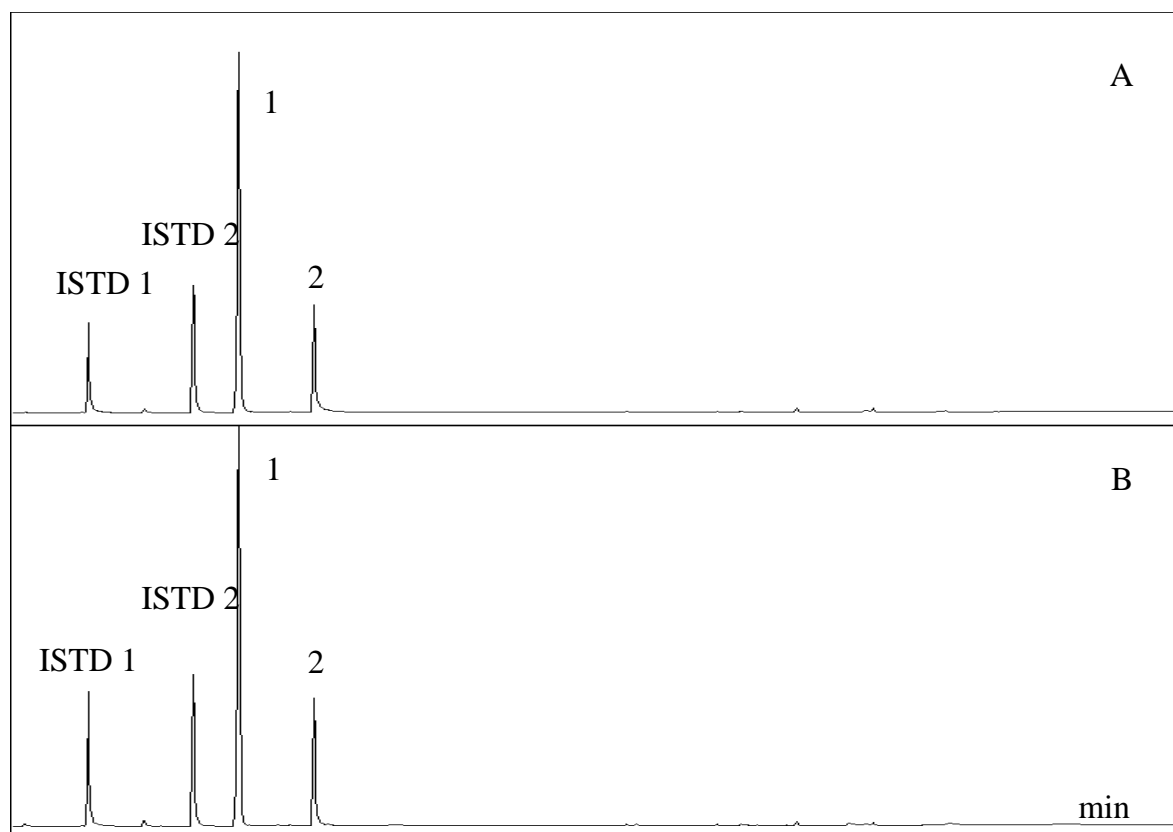


Abbildung 5-50: GC-FID-Chromatogramme der APG in den Waschmitteln Persil (A) und Perwoll (B) nach Hydrolyse

Probe: Persil (15,7 mg), Perwoll (4,3 mg). Hydrolyse mit 6 ml 2N HCl.
1 = n-Dodecanol, 2 = n-Tetradecanol, ISTD 1: n-Nonanol, ISTD 2: n-Undecanol.

Basis der quantitativen Analyse ist die externe Kalibrierung. In einer Doppelbestimmung wurden Standardlösungen der vier Fettalkohole C8-C14, gelöst in Ethylacetat, bei mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen im Arbeitsbereich von 6-80 µg/ml analysiert. Aus den Mittelwerten der Peakflächen wurden die Kalibriergeraden erstellt. Die quantitative Auswertung der Fertigprodukte erfolgte über die Peakflächen der Fettalkohole. Unter Annahme eines mittleren Polymerisationsgrades von 1,5 wurden die Fettalkoholmengen in den Gehalt an APG umgerechnet.

Der ermittelte APG-Gehalt wurde im letzten Schritt mit einem Korrekturfaktor versehen. Die Korrektur ist aus zwei Gründen notwendig. Wie in Kap. 5.7.2 beschrieben, werden APG unter den Reaktionsbedingungen (6 ml 2N HCl, 90 min, 103°C) nur zu etwa 85 % hydrolytisch gespalten. Dieser Wert verringert sich noch, wenn die Probe größere Anteile höher glucosidierter APG enthält. Inklusiv dem Verlust bei der Extraktion mit ENV+, Kieselgel und Ionenaustauschermaterial ergibt sich aus einer mittleren WF von 69 % ein Korrekturfaktor von 1,45. Die Genauigkeit dieses Faktors wurde in entsprechenden Wiederfindungsversuchen bestätigt. Dazu wurde das Duschbad "Tamara" mit Plantacare 818 UP dotiert. Unter Einbeziehung des Korrekturfaktors wurden in einem Dreifachansatz WF zwischen 94 und 103 % erreicht.

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Fertigprodukte mittels GC-FID nach SPE und saurer Hydrolyse sind in Tabelle 5-13 zusammengestellt. Verglichen mit der Bestimmung der APG mittels GC-MS nach Silylierung ist der ermittelte APG-Gehalt wesentlich höher, nach der Korrektur stimmen die Werte jedoch sehr gut überein.

Tabelle 5-13: Analyse von Fertigprodukten mittels GC-FID

	Produktklasse	APG-Gehalt (ermittelt)*	APG-Gehalt (korrigiert)**	Alkylkettenspektrum (C8-C10-C12-C14)***
Fa	Duschbad	3,8 ± 0,2 %	5,5 %	0-0-75-25
Nivea	Duschbad	4,3 ± 0,3 %	6,2 %	36-22-32-10
Palmolive	Duschbad	5,4 ± 0,1 %	7,7 %	0-0-76-24
Tamara	Duschbad	-	-	-
Persil	Flüssigwaschmittel	2,5 ± 0,2 %	3,6 %	0-0-77-23
Perwoll	Flüssigwaschmittel	11,5 ± 0,2 %	16,7 %	0-0-75-25
Badedas classic	Schaumbad	10,4 ± 0,3 %	15,1 %	26-16-43-15

Die Gehalte verstehen sich als Gesamtgehalt aller APG. Angegeben ist der prozentuale Anteil an der Trockenmasse als Mittelwert aus drei Bestimmungen.

* Der ermittelte Gehalt ist der Gewichtsanteil (%) der APG an der Trockenmasse.

** Der korrigierte APG-Gehalt errechnet sich aus dem ermittelten Gehalt und dem Korrekturfaktor 1,45.

*** Das Alkylkettenspektrum (%) ergibt sich aus dem Anteil jeder Alkylkette am ermittelten APG-Gehalt.

5.10.4 Bestimmung von APG in Fertigprodukten mittels HPLC-MS

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte RP-HPLC-MS-Methode konnte erfolgreich zur Bestimmung von APG in technischen und kosmetischen Erzeugnissen eingesetzt werden. Die erforderliche Analysenzeit reduziert sich auf unter 30 min. Es muß weder derivatisiert werden (GC-MS) noch ist die Abtrennung anderer Inhaltsstoffe durch eine Festphasenextraktion

notwendig. Detektiert werden im negativen Modus der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) die Quasimolekülonen $[M-H]^-$. Die quantitative Bestimmung der APG in Fertigprodukten erfolgte analog der Bestimmung in technischen Gemischen (Kap. 5.8.2.3).

Anhand der Abbildung 5-51 soll die Empfindlichkeit der entwickelten RP-HPLC-MS-Methode veranschaulicht werden. Leitungswasser wurde mit dem Schaumbad "Badedas classic" versetzt. Die Konzentration betrug 0,1 g Schaumbad/l Wasser. Bei einer Trockenmasse von ca. 20 % und einem APG-Gehalt der Trockenmasse von ~ 10 % entspricht dies einer APG-Konzentration von etwa 2 mg/l. Die Probe wurde nach Membranfiltration ohne weitere Aufarbeitung direkt analysiert. Detektiert wurden nur die Alkylmonoglucoside mittels APCI im negativen Modus und SIR.

Erwartungsgemäß konnten im Badewasser APG mit vier verschiedenen Alkylkettenlängen nachgewiesen werden. Weitere Begleitsstoffe wurden nicht detektiert, weil die gewählten Ionisationsparameter selektiv für APG gewählt waren. Die parallele UV-Detektion zum Nachweis UV-aktiver Inhaltsstoffe ergab bei der hohen Verdünnung erwartungsgemäß keine positiven Befunde.

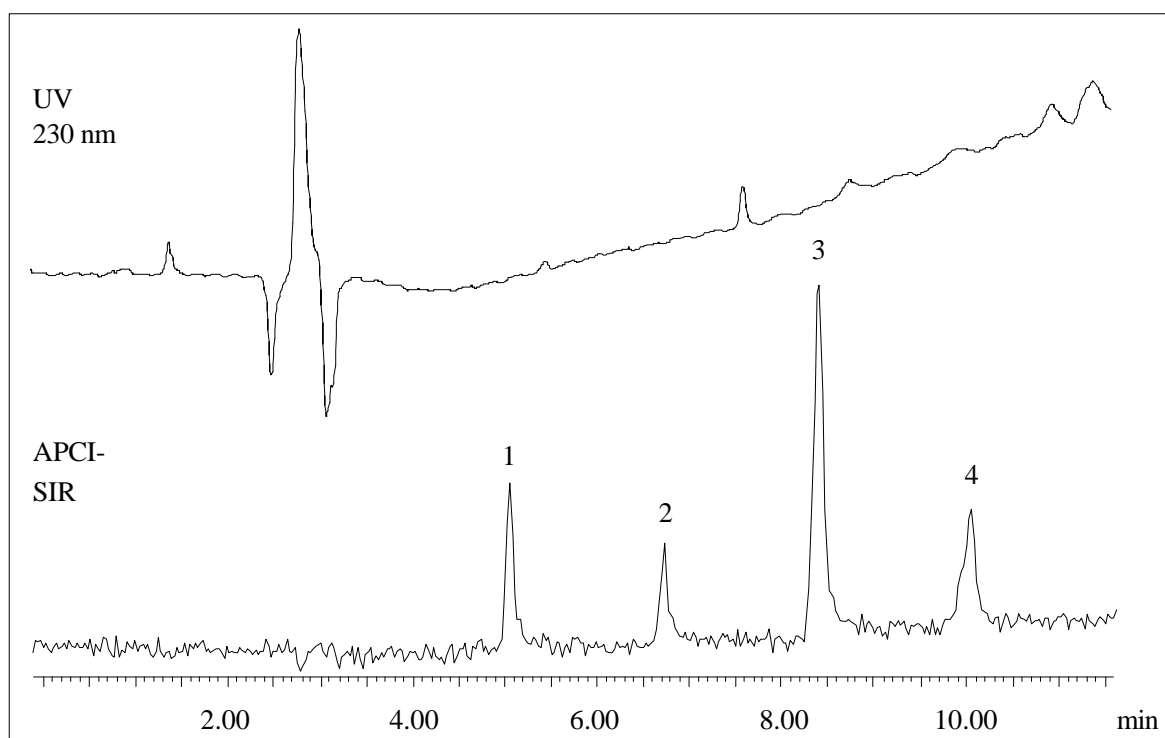


Abbildung 5-51: RP-HPLC-MS-Analyse einer Badewasserprobe

Zur HPLC: siehe Abbildung 5-37. Detektion: APCI- (SIR) und UV (230 nm).
 Probe: 2 µg Schaumbad "Badedas classic" (entspricht ca. 40 ng APG).
 1 = C8G1, 2 = C10G1, 3 = C12G1, 4 = C14G1

Zur quantitativen Bestimmung wurde die Trockensubstanz der Waschmittel und Kosmetika nach der Zugabe des ISTD im HPLC-Eluenten gelöst. Nach Membranfiltration wurden je 20 µl injiziert. Abbildung 5-52 zeigt die SIR-Chromatogramme der RP-C8-HPLC-Analyse des Duschbades "Fa".

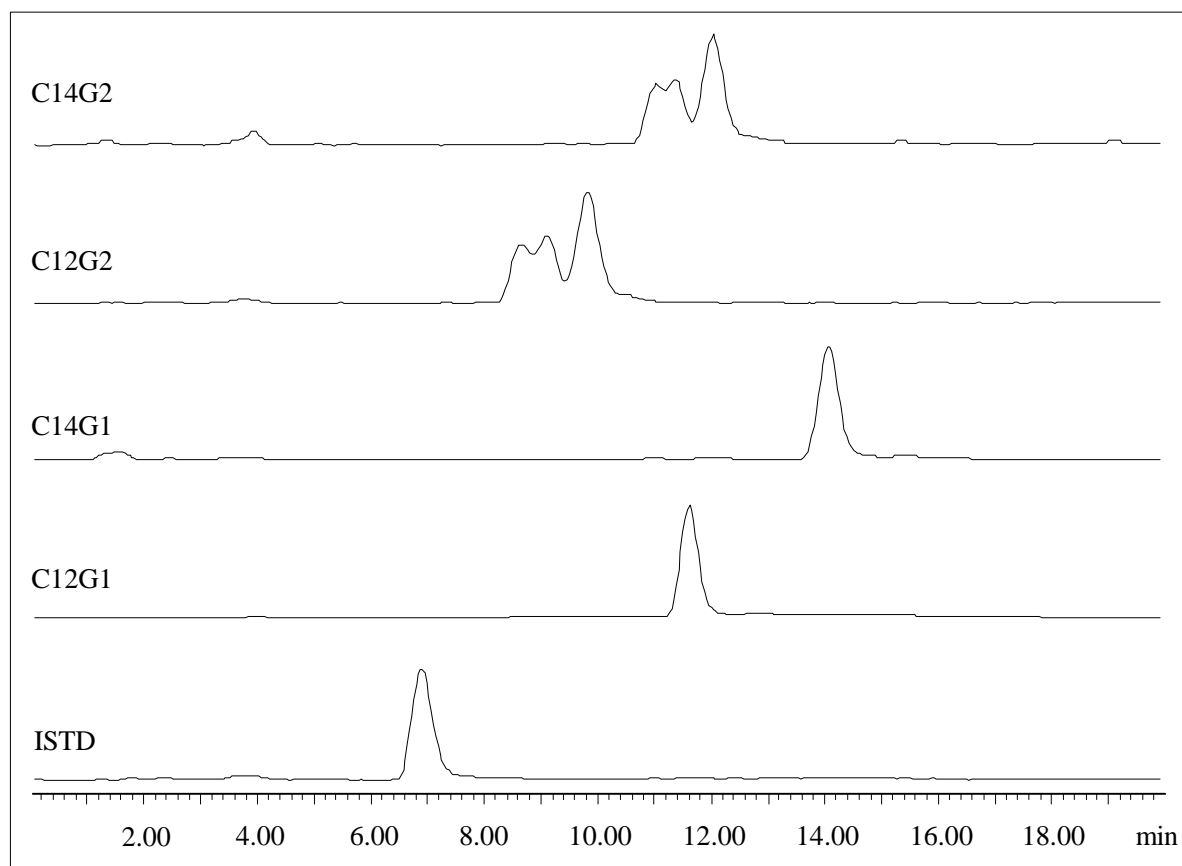


Abbildung 5-52: RP-HPLC-MS-Analyse der APG im Duschbad "Fa"

Probe: 6 µg Trockensubstanz. RP-C8-HPLC. Detektion: APCI- (SIR).
C9G1 ($m/z = 305$), C12G1 (347), C14G1 (375), C12G2 (509), C14G2 (537).

In den Ionenspuren der Monoglucoside C12G1 und C14G1 wird jeweils nur ein intensives Signal registriert, während die Ionenspuren der Diglucoside mehrere, zumeist unvollständig aufgelöste Peaks aufweisen. Zur Quantifizierung wurde die Peakfläche der Diglucoside gleicher Alkylkettenlänge aufsummiert. Der Gehalt der Fertigprodukte an Mono- und Diglucosiden wurde über eine externe Kalibrierung ermittelt. 20 µl einer Standardlösung mit insgesamt sieben Referenzsubstanzen (C8-C12G1, C8-C14G2) wurden im Konzentrationsbereich von 0,1-10 mg/l in einer Dreifachbestimmung analysiert. Aus den Mittelwerten der Peakflächen der fünf Eichpunkte wurden die Kalibriergeraden erstellt. Aus Mangel an Referenzmaterial wurde der Gehalt an C14G1 wieder über die Kalibrierung von C12G1 bestimmt.

Alle ermittelten APG-Gehalte wurden mit dem Faktor 1,5 multipliziert. Der Faktor ergibt sich aus dem Mittelwert des maximal bestimmbaren Anteils der Trockenmasse technischer APG-Gemische von 66 %. Schwankungen in der Detektion der Tenside wurden durch den ISTD C9G1 ausgeglichen. Diese Verbindung eignet sich besonders gut als ISTD, da sie die gleiche chemische Natur wie die Analyten besitzt, aufgrund der ungeraden Zahl an C-Atomen in den Proben aber nicht zu erwarten ist.

In Tabelle 5-14 sind die Ergebnisse der quantitativen HPLC-MS-Analyse von APG in Fertigprodukten den Ergebnissen der Bestimmungen mittels GC-MS und GC-FID gegenübergestellt.

Tabelle 5-14: APG-Gehalt in der Trockenmasse handelsüblicher Kosmetika

	Produktklasse	GC-MS	GC-FID	HPLC-MS	MW
Fa	Duschbad	6,2 %	5,5 %	5,4 %	5,7 %
Nivea	Duschbad	5,7 %	6,2 %	5,7 %	5,9 %
Palmolive	Duschbad	7,6 %	7,7 %	7,8 %	7,7 %
Tamara	Duschbad	-	-	-	-
Persil	Flüssigwaschmittel	4,0 %	3,6 %	3,5 %	3,7 %
Perwoll	Flüssigwaschmittel	15,7 %	16,7 %	14,9 %	15,8 %
Badedas classic	Schaumbad	15,0 %	15,1 %	13,5 %	14,5 %

Alle Angaben verstehen sich als Mittel aus drei Bestimmungen. Die ermittelten APG-Gehalte sind mit den Korrekturfaktoren 2,38 (GC-MS), 1,45 (GC-FID) bzw. 1,5 (HPLC-MS) multipliziert. Der Mittelwert MW bezeichnet den Mittelwert des APG-Gehaltes, berechnet aus den drei eingesetzten Analysenmethoden.

Wie die Gegenüberstellung zeigt, liefern die drei Methoden ähnliche Ergebnisse. Signifikante Unterschiede lassen sich nicht feststellen. Die Einzelwerte schwanken um weniger als 10 % um den errechneten Mittelwert. Damit ist erwiesen, daß die Einführung von Korrekturfaktoren, die die Besonderheiten der einzelnen Analysenmethoden berücksichtigen, sinnvoll ist.

Buschmann und Wodarczak [1995] fanden im Duschgel "Palmolive" einen APG-Gehalt von 1,1 %. Dieser Wert korreliert sehr gut mit dem Ergebnis dieser Arbeit. Die analysierten 7,7 % entsprechen einem APG-Gehalt von 1,1 % im Duschbad. Weniger Übereinstimmung ergibt sich für das Duschbad "Fa", wo statt der von Buschmann und Wodarczak [1995] ermittelten 3,7 % nur 1,1 % im Duschbad bzw. 5,7 % in der Trockensubstanz gefunden wurden. Eine mögliche Ursache könnte eine Rezepturänderung sein. Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Wert stellt das Mittel dreier unabhängiger Methoden dar, während Buschmann und Wodarczak ihre Angaben auf eine einzige analytische Methode stützen.

Die Genauigkeit der anderen Ergebnisse konnte nicht überprüft werden. Literaturangaben lagen zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit nicht vor und Anfragen bei den Herstellern (Colgate-Palmolive, Beiersdorf AG oder Schwarzkopf-Henkel) blieben ohne Erfolg.

Hinsichtlich der Alkylkettenverteilung konnten die Ergebnisse der GC-MS- und der GC-FID-Methode bestätigt werden. Die Flüssigwaschmittel Persil und Perwoll sowie die Duschbäder von Fa und Palmolive enthalten nur längerkettige APG (C12 und C14). Im Gegensatz dazu findet man im Duschbad von Nivea und im Schaumbad "Badedas classic" alle geradzahigen Alkylkettenlängen von C8 bis C14.

In Tabelle 5-15 wird das Alkylkettenspektrum kosmetischer Proben mit der Alkylkettenverteilung technischer APG-Gemische verglichen. Während die Alkylkettenverteilung der Duschbäder von Fa und Palmolive auf Plantacare 1200 UP als Basis hindeutet, bildet Plantacare 818 UP offensichtlich die Grundlage für das Schaumbad "Badedas classic". Dies gilt insbesondere, wenn man bedenkt, daß Henkel führender Produzent von technischen APG-Formulierungen in Deutschland ist und diese weltweit vertreibt.

Das Duschbad von Nivea enthält höchstwahrscheinlich das Gemisch Plantacare 2000 UP. Darauf deutet zumindestens die Übereinstimmung der Alkylkettenspektren hin.

Tabelle 5-15: Alkylkettenspektrum technischer und kosmetischer Erzeugnisse

Probe	C8	C10	C12	C14
Plantacare 818 UP *	25 %	15 %	45 %	15 %
Plantacare 1200 UP *			75 %	25 %
Plantacare 2000 UP *	34 %	21 %	34 %	11 %
Duschbad "Fa" **			74 (78) %	26 (22) %
Duschbad "Palmolive" **			75 (79) %	25 (21) %
Duschbad "Nivea" **	32 (33) %	21 (24) %	34 (33) %	13 (10) %
Schaumbad "Badedas classic" **	23 (23) %	14 (16) %	47 (46) %	16 (15) %

* Das Alkylkettenspektrum der technischen Gemische stellt den Mittelwert von GC-MS, GC-FID und HPLC-MS dar.

** Das Alkylkettenspektrum der Kosmetika wurde mittels HPLC-MS ermittelt. Gegenübergestellt sind die Verteilungen der Alkylmonoglucoside und Alkyldiglucoside (in Klammern).

Alkyldiglucoside weisen im Verhältnis zu den monoglucosidischen Komponenten eine leichte Verschiebung des Spektrums hin zu kürzerkettigen Alkylresten auf. Damit wurde die bereits bei den technischen Formulierungen beobachtete Verschiebung bestätigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die zur Quantifizierung eingesetzten Analysenmethoden sowohl in Bezug auf die Gehalte als auch hinsichtlich der Alkylkettenverteilung nahezu identische Ergebnisse liefern. Mit Hilfe von Korrekturfaktoren gelingt es methodenbedingte Unzulänglichkeiten in der vollständigen Erfassung aller vorkommender Einzelkomponenten hinreichend auszugleichen, was durch die Übereinstimmung der quantitativen Ergebnisse bestätigt wird.

6 Zusammenfassung

Im Projektbereich E des Sfb 193 der Deutschen Forschungsgemeinschaft "Biologische Behandlung industrieller und gewerblicher Abwässer" werden seit 1997 tensidhaltige Spülwässer aus der Batch-Produktion nichtionischer Tenside untersucht. Unter Anwendung verschiedener physiko-chemischer Trennverfahren (Membranverfahren, Schaumfraktionierung oder Adsorption an porösen Gläsern) sollten die Tenside aus den Abwässern angereichert werden. Ziel war es, sowohl die Tenside als auch das gereinigte Wasser einer Wiederverwendung zuzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von analytischen Methoden zur chemischen Charakterisierung von APG, einer neuen Klasse nichtionischer Tenside entwickelt. Mit diesen Methoden konnten die Prozesse der Anreicherung der Tenside aus Spülwässern, aber auch der biologische Abbau von nicht verwertbaren Restkonzentraten analytisch begleitet werden. Aus der Analyse einzelner Komponenten wurden Ansatzpunkte zur Verbesserung der Spülwasseraufarbeitung abgeleitet.

Bereits am Beginn der Arbeit wurde klar, daß es unrealistisch ist, sämtliche Fragestellungen hinsichtlich Screening, Quantifizierung und Aufklärung unbekannter APG-Strukturen mit nur einer Analysenmethode beantworten zu wollen. APG-Gemische sind äußerst komplex zusammengesetzt. Sie enthalten eine Vielzahl an homologen und stereoisomeren Komponenten. Die sehr verschiedene Polarität der Einzelkomponenten bereitet ebenso große Schwierigkeiten wie die fehlende UV-Aktivität der Verbindungen.

In der ersten Projektphase wurden einfache Bestimmungsmethoden zur Untersuchung synthetischer Abwässer erarbeitet. Ausgehend von den Erfahrungen der Vorbereitungsphase wurden HPTLC-Methoden entwickelt, mit denen Proben auf das Vorkommen von APG untersucht werden konnten. Durch die Detektion mit dem DAP-Reagenz gelang es Matrixeffekte weitgehend zu reduzieren. Eine Einzelkomponentenanalytik wurde wegen fehlender Auflösung und aus Mangel an geeignetem Referenzmaterial nicht erreicht.

Die quantitative Bestimmung von Alkylmonoglucosiden erfolgte zu Beginn des Projektes mittels GC-MS. Die TMS-Derivate wurden gaschromatographisch nach ihrem Alkylrest sowie nach verschiedenen Strukturmerkmalen (Bindungsisomere, Ringisomere) getrennt. Anhand charakteristischer Fragmente in den EI-Spektren konnten auch solche Alkylmonoglucoside identifiziert werden, die nicht als Referenzmaterial vorhanden waren. In Kombination mit der Gefriertrocknung waren Alkylmonoglucoside bis in den Bereich von

0,1 mg/l nachweisbar. Mit Einführung eines Korrekturfaktors gelang schließlich auch die Quantifizierung des APG-Gehaltes in kosmetischen Erzeugnissen sowie Wasch- und Reinigungsmitteln. Probleme traten insbesondere bei höher glucosidierten APG auf. Die Trockenmasse technischer APG-Gemische konnte nur zu etwa 42 % quantitativ erfaßt werden. Die daraus abgeleitete Vermutung, es könne sich bei einem Teil der nicht erfaßbaren Trockenmasse um salzartige Verunreinigungen handeln, konnte mit TOC-Bestimmungen nicht bestätigt werden.

Die Möglichkeit der Nutzung des HPLC-MS/MS-Gerätes beschleunigte die Entwicklung neuer Methoden zur Analyse von APG. Nachdem die optimalen Bedingungen zur Ionisation der APG gefunden waren, wurde eine weitere Screeningmethode, basierend auf der Fließinjektionsanalyse etabliert. Die hohe Selektivität der APCI-Detektion erlaubte in vielen Fällen die direkte Bestimmung von APG ohne vorhergehende Flüssigchromatographie. Das Fragmentierungsverhalten der Quasimolekülonen $[M-H]^-$ nach der Kollision mit Argon eignet sich zur Absicherung der mittels FIA-MS gefundenen Ergebnisse. Dagegen ist es nicht möglich, anhand von MS/MS-Spektren unbekannter Komponenten genaue Aussagen zu deren Stereochemie zu machen. Die Tochterionenspektren bestehen bedauerlicherweise bis auf wenige Ausnahmen aus wenig aussagekräftigen Fragmenten, die aus dem Kohlenhydratanteil der APG-Moleküle hervorgehen.

Die Kopplung der HPLC mit der massenselektiven Detektion wurde erfolgreich zur Bestimmung von APG in technischen und kosmetischen Formulierungen eingesetzt. Durch die Erfassung der diglucosidischen Komponenten war es möglich, etwa 66 % der Trockenmasse zu bestimmen. In Kombination mit der Festphasenextraktion wurden Nachweisgrenzen im Bereich von 0,1 µg/l erreicht. Verschiedene Festphasen waren auf ihre Fähigkeit zur Extraktion von APG aus wäßrigen Proben getestet worden. Dabei stellte sich heraus, daß alle untersuchten SPE-Phasen zur Extraktion geeignet wären, aus rein praktischen Gründen wurde später ENV+ verwendet. Mit diesem Material wurden über einen sehr weiten Konzentrationsbereich WF von über 80 % erreicht.

Die saure Hydrolyse von APG hatte die Spaltung der Tenside zur Folge. Der freigesetzte Fettalkohol konnte mittels GC-FID sehr leicht analysiert werden. Dabei wurden auf wenige Peaks reduzierte GC-FID-Chromatogramme erhalten. Das Spektrum der Fettalkohole spiegelt die Alkylkettenverteilung der hydrolysierten APG-Gemische sehr genau wider. Eine Veränderung des Alkylkettenspektrums infolge der Anreicherung von APG mittels Schaumfraktionierung konnte nachgewiesen werden. Trotz des Verlustes an Informationen

zum Glucosidierungsgrad der Tenside hat sich diese Methode in der Routineanalytik aufgrund ihrer Robustheit bewährt. Voraussetzung zur quantitativen Analyse kosmetischer Proben war die Extraktion der APG aus ihrer komplexen Umgebung. Nach der Anreicherung an ENV+ wurden die Proben an Kieselgel und Ionenaustauschermaterial gereinigt.

Wie die Übereinstimmung der Analysenergebnisse der Bestimmung von APG in kosmetischen Erzeugnissen und Waschmitteln zeigt, ist die Einführung von spezifischen Korrekturfaktoren, die die Besonderheiten der einzelnen Analysenmethoden berücksichtigen, durchaus sinnvoll.

Neben dem Screening und der quantitativen Analyse einzelner Verbindungen bildete die Aufklärung unbekannter Komponenten einen weiteren Schwerpunkt in dieser Arbeit. Die Analyse technischer Gemische mittels MALDI-TOF-MS führte zum Nachweis von oligomeren Komponenten mit bis zu 10 Glucoseeinheiten im Molekül. Die dabei detektierten Peakhöhen deuten auf eine Poisson-Verteilung der einzelnen Glucosidierungsgrade hin.

Alkyldiglucoside werden flüssigchromatographisch sowohl an RP-C8 als auch an Hypercarb S in verschiedene Stereoisomere getrennt. MS/MS-Untersuchungen der getrennten Isomere blieben ohne Erfolg. Zwar können sie anhand ihrer Tochterionen-Spektren unterschieden werden, eine genaue Charakterisierung der Struktur war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen jedoch nicht möglich.

Wichtigstes Instrument bei der Strukturaufklärung war die Kernresonanzspektroskopie (NMR). Nach der Anreicherung über eine doppelte SPE an ENV+ und nachfolgender flüssigchromatographischer Fraktionierung wurden isolierte Isomere mittels ^1H - und ^{13}C -NMR untersucht. Dabei konnte n-Decyl- $\alpha(1\rightarrow6)$ Isomaltosid als eine der diglucosidischen Hauptkomponenten in Glucopon 225 identifiziert werden.

Ungelöst bleibt die Bestimmung von APG in Bioreaktorproben. Längerkettige APG adsorbieren derartig an der Oberfläche von Bakterien, daß es nicht möglich war, die Abnahme des APG-Gehaltes entweder der Adsorption oder dem biologischen Abbau eindeutig zuzuordnen. Als Alternative verbleibt lediglich die Bestimmung der APG im Überstand des Bioreaktors.

7 Literatur

- Albert, K. (1999): LC-NMR-Kopplung. Analytiker-Taschenbuch 20. Berlin, Springer-Verlag, 107-139
- Andree, H.; Middelhaue, B. (1991): Möglichkeiten des Einsatzes von Alkylpolyglucosiden in Wasch- und Spülmitteln. *Tenside Surf. Det.* 28, 413-418
- Asmussen, C.; Stan, H.-J. (1998a): Determination of Non-Ionic Surfactants of the Alcohol Ethoxylate Type by means of High-Temperature Gas Chromatography and Atomic Emission Detection. *J. High Resolut. Chromat.* 21, 597-604
- Asmussen, C.; Stan, H.-J. (1998b): Charakterisierung von Alkylethoxylaten - Beispiele prozeßbegleitender Analytik. Schriftenreihe des Sfb 193 "Biologische Abwasserreinigung". Entwicklungen zur Produkt- und Wasserrückgewinnung. ISBN 3-7983-1778-X, 237-252
- Balzer, D. (1991): Alkylpolyglucosides, their Physico-chemical Properties and their Uses. *Tenside Surf. Det.* 28, 419-427
- Balzer, D.; Ripke, N. (1992): Alkylpolyglucoside - Herstellung und Anwendung: SÖFW-Journal 118, 894-904
- Bester, K.; Huhnerfuss, H. (1997): Improvements of a combined size exclusion chromatography and solid phase extraction approach for the clean-up marine sediment samples for the trace analysis of pesticides. *Fres. J. Anal. Chem.* 358, 630-634
- Billian, P. (1996): Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Fettalkoholethoxylaten in Wasser. Diplomarbeit an der Technischen Universität Berlin, Institut für Lebensmittelchemie
- Billian, P.; Stan, H.-J. (1998): Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Alkyl Polyglucosides as their Trimethylsilylethers. *Tenside Surf. Det.* 35, 181-184
- Blau, K.; Halket, J. (1993): Handbook of Derivatives for Chromatography. Chichester, Wiley
- Böcker, J. (1997): Chromatographie. Würzburg, Vogel-Verlag
- Böge, K.; Tietze, L.F. (1998): Synthesis of alkyl polyglycosides: Effect of catalyst-type on reaction rate and product composition. *Lipid* 100, 36-41
- Bruns, A.; Waldhoff, H.; Winkle, W. (1989): Applications of HPLC with Evaporative Light Scattering Detection in Fat and Carbohydrate Chemistry. *Chromatographia* 27, 340-342
- Busch, P.; Hensen, H.; Tesmann, H. (1993): Alkylpolyglycoside - eine neue Tensidgeneration für die Kosmetik. *Tenside Surf. Det.* 30, 116-121
- Buschmann, N.; Kruse, A. (1995): Separation and detection of alkylpolyglucosides. *Jorn. Com. Esp. Deterg.* 26, 209-213
- Buschmann, N.; Wodarczak, S. (1994): Analytical Methods for Carbohydrate Surfactants. *Jorn. Com. Esp. Deterg.* 25, 203-207
- Buschmann, N.; Wodarczak, S. (1995): Analytical Methods for alkylpolyglucosides. *Tenside Surf. Det.* 32, 336-339
- Carminati, G.; Cavalli, L.; Buosi, F. (1988): Application of ^{13}C NMR to the Identification of Surfactants in Mixture. *JAOCS* 65, 669-677

- Cresenzi, C.; Di Corcia, A.; Samperi, R. (1996): Determination of Nonionic Polyethoxylate surfactants in Environmental Waters by Liquid-Chromatography/Electrospray mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 67, 1797-1804
- Cserhati, T.; Forgacs, E. (1997): Separation and quantitative determination of non-ionic surfactants used as pesticide additives. *J. Chromatogr. A* 774, 265-279
- DeJongh, D.C.; Radford, T.; Hribar, J.D.; Hanessian, S.; Bieber, M.; Dawson, G.; Sweeley, C.C. (1969): Analysis of Trimethylsilyl Derivatives of Carbohydrates by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 1728-1740
- Di Corcia, A. (1998): Characterization of surfactants and their biointermediates by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 794, 165-185
- Dr. Lange Küvettentest LCK 380 (1996)
- Eichhorn, P.; Knepper, T.P. (1999): Investigations on the metabolism of alkyl polyglucosides and their determination in waste water by means of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 854, 221-232
- Elfakir, C.; Lafosse, M. (1997): Porous graphitized carbon and octadecyl-silica columns in the separation of some alkylglycoside detergents. *J. Chromatogr. A* 782, 191-198
- Facino, R.M.; Carini, M.; Depta, G.; Bernadi, P.; Casetta, B. (1995): Atmospheric-Pressure Ionization Mass-Spectrometric Analysis of New Anionic Surfactants: The Alkylpolyglucoside Esters. *JAOCS* 72, 1-9
- Fischer, E. (1893): Ueber die Glucoside der Alkohole. *Chem. Ber.* 26, 2400-2412
- Flory, P.J. (1952): Molecular Size Distribution in Three Dimensional Polymers. VI. Branched Polymers Containing A-R-B_{f-1} Type Units. *J. Amer. Chem. Soc.* 85, 2497-2507
- Focher, B.; Savelli, G.; Torri, G. (1990): Neutral and ionic alkylglucopyranosides. Synthesis, characterization and properties. *Chem. Phys. Lip.* 53, 141-155
- Garst, R. (1997): Alkylpolyglycoside - neue Lösungen für landwirtschaftliche Anwendungen. *Henkel-Referate* 34, 104-109
- Hammes, C.; Meister, J.; Berchter, M. (1997): Tensidanalytik mit MALDI-TOF-MS. *Henkel-Referate* 33, 108-114
- Henkel KGaA (1997): European Laboratories. Alkyl polyglycosides, renewable surfactants from coconut and corn. *Carbohydrates in Europe* 18, 18-27
- Hill, K.; von Rybinski, W.; Stoll, G. (1997): Alkyl Polyglycosides. Technology, Properties and Applications. Weinheim, VCH
- Hillenkamp, F.; Karas, M. (1991): Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal. Chem.* 63, 1193A-1202A
- Hübschmann, H.-J. (1996): Handbuch der GC/MS. Grundlagen und Anwendungen. Weinheim, VCH
- Kahre, J.; Tesmann, H. (1995): Alkylpolyglucoside - ein neues Konzept für Pflege und Verträglichkeit in der Kosmetik. *SÖFW-Journal* 121, 598-611
- Kakac, B.; Veydelek, Z.J. (1974): Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen. Weinheim, VCH

- Kiewiet, A.T.; De Voogt, P. (1996): Chromatographic tools for analyzing and tracking non-ionic surfactants in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* 733, 185-192
- Klauffke, H.S.; Neubert, T.; Kroh, L.W. (1998): Analysis of Alkyl Polyglucosides using Liquid Chromatographic Methods. *Tenside Surf. Det.* 35, 108-111
- Klauffke, S.; Neubert, T.; Kroh, L.W. (1999): Determination of nonionic surfactants by LC/MS technique using alkyl polyglycosides as model substance. *Tenside Surf. Det.* 36, 178-184
- Koizumi, K. (1996): High-Performance liquid chromatographic separation of carbohydrates on graphitized carbon columns. *J. Chromatogr. A* 720, 119-126
- Kroh, L.W.; Neubert, T.; Raabe, E.; Waldhoff, H. (1999): Enzymatic analysis of alkyl polyglycosides. *Tenside Surf. Det.* 36, 19-21
- Lotz, S. (1999): Gelpermeationschromatographie - ein wichtiger Problemlöser in der Polymeranalytik. *GIT-Labor-Fachzeitschrift*, 806-811
- Matsumara, S.; Imai, K.; Yoshikawa, S.; Kawada, K.; Uchibori, T. (1990): Surface Activities, Biodegradability and Antimicrobial Properties of α -Alkyl Glucosides, Mannosides and Galactosides. *JAOCS* 67, 996-1001
- McLafferty, F.W.; Turecek, F. (1995): Interpretation von Massenspektren. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag
- Meissner, C.; Engelhardt, H. (1997): Einsatz von HPLC-Fluoreszenzdetektion und GC/MS in der Spurenanalytik von Tensiden. Tagungsband der InCom 97 (Düsseldorf), 148
- Mengerink, Y.; De Man, H.C.J.; Van Der Wal, S. (1991): Use of an evaporative light scattering detector in reversed-phase high-performance liquid chromatography of oligomeric surfactants. *J. Chromatogr.* 552, 593-604
- Müller, E.; Hellmut, J. (1993): On-Line Coupling of HPLC, Solid Phase extraction and TLC. *J. Planar Chrom.* 6, 21
- Newsome, W.H.; Collins, P. (1989): Multiresidue method for fungicides in fruit and vegetables. *J. Chromatogr.* 472, 416-421
- Pasch, H.; Kilz, P. (1999): Copolymeranalytik mit on-line gekoppelter 2D-Chromatographie. *GIT-Labor-Fachzeitschrift*, 239-244
- Produktinformation Glucosid 24 (1995): Datenblatt. Marl, Hüls AG
- Produktinformation Plantacare 818 UP (1996): Datenblatt. Düsseldorf, Henkel KGaA
- Produktinformation Plantacare 1200 UP (1996): Datenblatt. Düsseldorf, Henkel KGaA
- Produktinformation Plantacare 2000 UP (1996): Datenblatt. Düsseldorf, Henkel KGaA
- Reemtsma, T.; Knepper, T. (1999): Das Potential der HPLC-MS in der Wasserchemie. *Nach. Chem. Tech. Lab* 47, 1250-1252
- Rehm, H. (1997): Maldi-TOF. *Laborjournal* 4/97, 13
- Schlotterbeck, G.; Pasch, H.; Albert, K. (1997): On-line HPLC ^1H NMR coupling for the analysis of fatty alcohol ethoxylates. *Polymer Bulletin* 38, 673-679
- Schmitt, T.M. (1992): Analysis of Surfactants. New York, Dekker
- Schöberl, P. (1997): Ökologische Bewertung von Tensiden. *Tenside Surf. Det.* 34, 28-36

- Schreiber, A.; Efer, J.; Ceglarek, U.; Engewald, W. (1998): Identifizierung und Quantifizierung anionischer und nichtionischer Tenside. GIT-Labor-Fachzeitschrift, 1050-1055
- Spilker, R.; Menzebach, B.; Schneider, U.; Venn, I. (1996): Analytik von Alkylpolyglucosiden. Tenside Surf. Det. 33, 21-25
- Stahl, E. (1967): Dünnschichtchromatographie. Ein Laboratoriumshandbuch. Berlin Heidelberg New York, Springer-Verlag
- Stan, H.-J.; Heberer, T.; Billian, P. (1998): Bestimmung von Fettalkoholethoxylaten in Trinkwasser. Vom Wasser 90, 93-105
- Steber, S.; Guhl, W.; Stelter, N.; Schröder, F.R. (1995): Alkyl Polyglucosides - ecological evaluation of a new generation of nonionic surfactants. Tenside Surf. Det. 32, 515-521
- Sweeley, C.C.; Bentley, R.; Makita, M.; Wells, W.W. (1963): Gas-Liquid Chromatography of Trimethylsilyl Derivatives of Sugars and Related Substances. J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497-2507
- Syhre, M.; Hanschmann, G.; Heber, R. (1996): Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik. GIT-Labor-Fachzeitschrift, 1121-1128
- Tietze, L.F.; Böge, K.; Vill, V. (1994): Liquid-Crystalline D-Glucose Dialkyl Acetals and Dodecyl D-Glucofuranosides. Chem. Ber. 127, 1065-1068
- Thiele, B.; Günther, K.; Schwuger, M.J. (1998): Spurenanalytik von Tensiden. Analytiker-Taschenbuch 18. Berlin, Springer-Verlag, 45-66
- Von Rybinski, W.; Hill, K. (1998): Alkylpolyglucoside - Eigenschaften und Anwendungen einer neuen Tensidklasse. Angew. Chem. 110, 1394-1412
- Vahl, M.; Graven, R.; Juhler, K. (1998): Analysis of Chlormequat residues in grain using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). Fres. J. Anal. Chem. 361, 817-820
- Ventura, F. (1991): Identification of [(Alkyloxy)polyethoxy]carboxylates in Raw and Drinking Water by Mass Spectrometry/Mass Spectrometry and Mass Determination Using Fast Atom Bombardment and Nonionic Surfactants as Internal Standards. Anal. Chem. 63, 2095-2099
- Waldhoff, H.; Scherler, J.; Schmitt, M. (1997): Analyse von Alkylpolyglycosiden. Henkel-Referate 33, 97-102
- Wodarczak, S.; Burford, M. (1998): Bestimmung von Alkylpolyglucosiden in Abwasserproben mittels SPE und HPLC. Posterbeitrag auf dem "Tag der Tenside" in Leipzig, 30./31.03.98

Anhang: Standardsubstanzen, Lösungsmittel/Chemikalien und Material

I. Standardsubstanzen

Produkt	Spezifikation, Hersteller
<i>Alkylpolyglucoside</i>	
n-Octyl-d ₁₇ -β-D-Glucopyranosid (C8D ₁₇ G1)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Octyl-d ₁₇ -β-D-Glucopyranosid-d ₇	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Hexyl-β-D-Glycopyranosid	>95 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Heptyl-β-D-Glucopyranosid (C7G1)	>99 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Octyl-β-D-Glucopyranosid (C8G1)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Nonyl-β-D-Glucopyranosid (C9G1)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Decyl-β-D-Glucopyranosid (C10G1)	>99 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Decyl-α-D-Glucopyranosid (C10-α-G1)	>95 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Dodecyl-β-D-Glucopyranosid (C12G1)	>99 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Octyl-β-D-Maltopyranosid (C8G2)	>99 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Decyl-β-D-Maltopyranosid (C10G2)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Undecyl-β-D-Maltopyranosid (C11G2)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (C12G2)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Dodecyl-α-D-Maltopyranosid (C12-α-G2)	>98 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Tetradecyl-β-D-Maltopyranosid (C14G2)	>99 % (HPLC), Anatrace, Maumee
n-Hexadecyl-β-D-Maltopyranosid (C16G2)	>97 % (HPLC), Anatrace, Maumee
<i>Fettalkohole</i>	
n-Octanol (C8OH)	~ 99 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Nonanol (C9OH)	~ 98 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Decanol (C10OH)	~ 98 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Undecanol (C11OH)	~ 98 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Dodecanol (C12OH)	~ 99 % (GC), Sigma, Steinheim
n-Tetradecanol (C14OH)	~ 96 % (GC), Sigma, Steinheim

II. Lösungsmittel/Chemikalien

Produkt	Spezifikation, Hersteller
<i>Lösungsmittel</i>	
Acetonitril	LiChrosolv® Gradient Grade, Merck, Darmstadt
Acetonitril	NMR CHROMASOLV®, Riedel de Haen, Seelze
Chloroform	Merck Darmstadt
Cyclohexan	Pestanal®, Riedel de Haen, Seelze
D ₂ O	99,9 % D, Cambridge Isotope Lab., Andover
Dimethyl-d ₆ -sulfoxid	99,9 % D, Sigma, Steinheim
Ethylacetat	Pestanal®, Riedel de Haen, Seelze
Methanol	LiChrosolv® Gradient Grade, Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
n-Butanol	Fluka, Neu-Ulm
n-Hexan	SupraSolv®, Merck, Darmstadt
Pyridin	Merck Darmstadt
Tetrahydrofuran	Merck Darmstadt
Wasser (HPLC)	HPLC-Grade, Mallinckrodt Baker, Griesheim
<i>Sonstige Chemikalien</i>	
Anilin	Fluka, Neu-Ulm
Diphenylamin	Fluka, Neu-Ulm
Essigsäure	99-100 %, Mallinckrodt Baker, Griesheim
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA)	Sigma, Steinheim
Natriumazid	99 %, Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck Darmstadt
Phosphorsäure	85%ig, Merck, Darmstadt
Primulin	Direct Yellow 59, Aldrich, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure	Sigma, Steinheim
Tril Sil®	Aldrich, Steinheim
α-Cyano-4-Hydroxymizsäure	Sigma, Steinheim

III. Material

Produkt	Spezifikation, Hersteller
<i>Festphasenextraktion</i>	
Bakerbond Polar Plus	Mallinckrodt Baker, Griesheim
ENV+	Separtis, Grenzach-Wyhlen
ENVI-Carb	Supelco, Deisenhofen
Europrep 60-30 C18	Knauer, Berlin
Kieselgel	Separtis, Grenzach-Wyhlen
Mischphase (ENV+/C18)	ICT, Bad Homburg
SAX, SCX	Separtis, Grenzach-Wyhlen
SDB 1, SDB 2	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Vakuum-Arbeitsstation Baker spe-12G	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Filtrationssäulen (3 ml, 6 ml)	Separtis, Grenzach-Wyhlen
Leerreservoir (70 ml)	Separtis, Grenzach-Wyhlen
PTFE-Fritten	Separtis, Grenzach-Wyhlen
<i>TLC-Fertigplatten</i>	
Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 10x20 cm, 200 µm	Art.-Nr. 1.05642, Merck, Darmstadt
RP-C18 10x20 cm, 200 µm	Art.-Nr. 1.05914, Merck, Darmstadt
2D-DC-Platten (Multi-K Dual Phase)	Art.-Nr. 4804820, Alltech, Unterhaching
<i>Sonstiges</i>	
Argon 5.0	99,999 %, Messer, Berlin
Membranfilter	Polyamid (0,2 µm), M & W, Berlin
Dr. Lange Küvettentest LCK N 381	Dr. Lange GmbH, Düsseldorf
Head-Space-Probengefäße	20 ml, Hewlett Packard, Waldbronn
Butyl-Septen (20 mm)	PTFE-beschichtet, Hewlett Packard, Waldbronn

Lebenslauf

Name: Patrick Billian

Anschrift: Waldowstraße 15, 13403 Berlin

Geburtsdatum: 18.11.1970

Geburtsort: Neuruppin

Familienstand: verheiratet

1977-1987 Realschule, Falkensee

1987-1990 Berufsausbildung mit Abitur/Mercedes Benz Ludwigsfelde

1990-1991 Wehrdienst, Ludwigsfelde

1991-1996 Studium der Lebensmittelchemie, Technische Universität Berlin

18.01.1996 Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker, Teil A

1996 Diplomarbeit "Entwicklung einer Analysenmethode zur Bestimmung von Fettalkoholethoxylaten in Wasser"

22.11.1996 Diplom-Hauptprüfung

1997-2000 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin im Sonderforschungsbereich 193, Projektbereich E2: "Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden" unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan

seit 1997 Anfertigung der vorliegenden Dissertation "Chemische Charakterisierung von Alkylpolyglucosiden" unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H.-J. Stan